

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

COMITÉ DE RÉDACTION

D^r CALMETTE, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r L. MARTIN, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r ROUX, directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r VAILLARD, membre de l'Académie de Médecine.

TOME QUARANTE ET UNIÈME

1927

AVEC 18 PLANCHES

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

HYGIENISCH LABORATORIUM
DER
TECHNISCHE HOOGESCHOOL
DELFT.

QR
1
A475
v.41
1927
PER

ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

TOUS LES ANNÉES LE 15 OCTOBRE DE CH. PASTEUR

R. DUBOIS

CH. PASTEUR

PARIS. — L. MARETHEUX, IMPRIMEUR, 1, RUE CASSETTE.

TOME QUARANTE ET DEUXIÈME

1892

PARIS

MARION ET C^{ie} ÉDITEURS

ÉDITEURS DE LA BIBLIOTHÈQUE DE MONTMARTRE

10, Boulevard de Montmartre, 10

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LES SPIROCHÈTES CÆCAUX

par le professeur G. SANARELLI,
Directeur de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Rome.

(AVEC DEUX PLANCHES)

I. — Aperçu des connaissances actuelles sur les spirochètes de l'appareil digestif.

La découverte des spirochètes pathogènes agents de maladies spécifiques, réalisée dans une époque récente grâce à l'emploi de l'ultra-microscope et des procédés d'imprégnation argentine, a attiré l'attention sur d'autres spirochètes considérés généralement comme des saprophytes, mais connus depuis quelque temps, car ils sont visibles sans l'aide d'une technique particulière.

Ces spirochètes, signalés, il y a déjà bien des années, spécialement dans l'appareil digestif, sain ou malade, de l'homme et des animaux, avaient été regardés depuis longtemps comme des commensaux inoffensifs, appartenant à cette flore intestinale si riche et variée, qui est l'hôte inséparable

des dernières portions du canal alimentaire, surtout du cæcum.

C'est, en effet, dès 1884 que Escherich (1) a remarqué, le premier, dans les déjections de cholériques, la présence d'un grand nombre de micro-organismes spirillaires, analogues à ceux des dents.

L'observation de Escherich fut confirmée, dans des cas analogues, par beaucoup d'autres auteurs pendant la dizaine d'années successives.

En 1894, à l'occasion de recherches que j'effectuais sur les vibrions intestinaux des cobayes, je fis une constatation semblable dans l'intestin diarrhéique de ces animaux (2).

« ... L'examen diarrhéique du gros intestin, lequel est profondément frappé, est encore — écrivais-je alors — plus intéressant.

« Ici les vibrions de Massouah se distinguent assez bien au milieu des microbes si variés de l'intestin, mais ils ne sont jamais prépondérants, et, à côté d'eux, on observe un nombre parfois colossal de spirilles... Ces spirilles se colorent, en général, avec une certaine difficulté, même en employant la fuchsine phéniquée de Ziehl : quelques-uns sont gros au centre et effilés aux extrémités à la manière des *spirochètes*; quelques-uns sont très minces, en forme d'élégantes spirales; d'autres, d'un diamètre uniforme, présentent, sur leur longueur, deux ou trois courbures; d'autres, enfin, ont simplement l'aspect de petites virgules. Toutes ces variétés de vibrions semblent trouver, dans l'intestin diarrhéique des cobayes, le milieu le plus propice à leur multiplication.

« En goutte pendante, quelques-uns de ces spirilles sont très agiles et traversent le champ avec rapidité, d'autres possèdent seulement un mouvement vibratoire lent et régulier; d'autres, enfin, semblent presque absolument immobiles.

« Quant à leur provenance, il ne peut y avoir aucun doute; j'en avais déjà observé de pareils, spécialement certaines formes nettement spirillaires, dans l'intestin des cobayes normaux, et l'unique circonstance notable était celle de leur énorme multiplication dans l'intestin diarrhéique.

(1) Klinisch-therapeutische Beobachtungen aus der Choleraepidemie in Neapel. *Münch. med. Woch.*, 1884, n° 54.

(2) Les vibrions intestinaux. *Ces Annales*, 1895, p. 129.

« J'échouai dans une longue série de tentatives d'isolement de ces microbes.

« En rapprochant cet insuccès de leur prodigieuse multiplication dans l'intestin diarrhéique des animaux, je me demandai s'ils ne trouvaient pas, dans l'intestin malade, des conditions propices à leur développement... »

Quelques années après mes observations, Le Dantec (1), en se basant sur des examens coprologiques dans des cas de dysenterie, nostras et coloniale, qui l'avaient frappé par la quantité énorme de spirochètes dans les déjections, attira l'attention sur le rôle éventuellement pathogène de ce parasitisme intestinal, et créa, plus tard, une entité morbide nouvelle, la « dysenterie spirillaire » ou « dysenterie à spirochètes » (2), que l'auteur a soigneusement décrite même dans la quatrième édition (1924) de son *Précis de Pathologie exotique*.

En général, les auteurs n'ont pas accepté ce type nouveau de dysenterie à spirochètes, et cela même pour la raison que le spirochète des selles normales, appelé *Sp. eurygyrata* et identifié généralement avec celui de Le Dantec, se trouve souvent en grande quantité dans la dysenterie bacillaire authentique et dans la d. amibienne. Mais, dès lors, les observations sur des spirochètoses intestinales se sont multipliées et ont paru dans tous les pays.

Les grandes décharges de spirochètes fécaux dans les processus pathologiques les plus divers de l'appareil digestif ont attiré toujours plus l'attention des auteurs qui, même aujourd'hui, posent la question de la signification et de l'importance de la prodigieuse prolifération intestinale de ces microbes, qui normalement sont, au contraire, fort peu nombreux ou manquent complètement dans le canal digestif.

En effet, pendant les vingt dernières années, la littérature médicale sur les spirochètoses intestinales s'est enrichie avec un rythme accéléré. Une juste mise au point de ce chapitre nouveau et intéressant de microbiologie digestive se trouve dans les Revues critiques récentes de Delamare (3) et de

(1) Note sur la présence de spirilles dans les mucosités dysentériques. *Gazette hebdomadaire des Sciences médicales de Bordeaux*, 1900, 31, p. 196.

(2) Dysenterie spirillaire. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1903, 55, p. 617.

(3) Spirochètoses intestinales. *Ann. de Médecine*, avril 1924, p. 315.

Saenz (1), auxquelles nous renvoyons ceux qui désirent des renseignements bibliographiques plus complets.

Bref, l'apparition de quantités parfois si énormes de spirochètes dans les déjections, de manière à constituer presque une culture pure de ces microbes, un vrai feutre ou « tissu spirillaire » comme dit Le Dantec, a été déjà décrite bien des fois non seulement dans le choléra nostras et le choléra asiatique, mais aussi dans les entérocolites, aiguës ou chroniques, continues ou récidivantes, catarrhales, bénignes, gangreneuses, ulcéreuses, hémorragiques, fétides, algides, dysentériques, etc., dans les diarrhées de l'enfance et celles cholériques, dans l'insuffisance gastrique, les lésions ulcéro-membraneuses du rectum, les recto-sigmoïdites dysentériques et les simples mucorrhées, comme aussi dans l'amibiase chronique, les entérites aiguës morbilleuses et scarlatineuses, les appendicites aiguës, les diarrhées produites par des *Lamblia*s, des *Trichomonas* et d'autres parasites intestinaux, dans des carcinomes de l'estomac, du duodénum, etc.

Récemment, Sabrazès (2) a attiré l'attention sur la présence de grandes quantités de spirochètes même dans les selles de typhoïdiques et a fait, aussi, allusion à un possible rôle actif de ces microbes dans la pathogénie des lésions intestinales dothiéntériques.

On peut désormais affirmer que la spirochètose intestinale constitue un apanage assez fréquent de presque toutes les manifestations de la pathologie digestive de l'homme et des animaux.

En effet, elle a été aussi signalée dans la dysenterie du singe, dans des affections hémorragiques gastro-intestinales, des stomatites ulcéro-membraneuses et des ulcérations du périnée et du prépuce du chien, dans la peste et certaines ulcérations cutanées du porc, dans le catarrhe nasal, dans certaines manifestations papillomateuses et des affections nécrotiques des solipèdes, dans les ulcérations gastriques du renard, dans des tumeurs cancéreuses ulcérées ou non ulcérées du rat, etc.

La présence de spirochètes, dans des conditions générales

(1) Espiroquetosis intestinal pura. *Anales de la Facultad de Medicina de Montevideo*, août 1923, p. 621.

(2) Spirochètes de l'intestin des typhiques et des paratyphiques. *Gazette hebdomadaire des Sc. méd. de Bordeaux*, 28 mars et 11 avril 1926.

normales, a été constatée dans l'appareil digestif de bovidés, de solipèdes, de chiens, de chats, de porcs, de renards, de rats, d'oiseaux, de grenouilles, de poissons, d'huîtres, etc.

Chez l'homme aussi, on a décrit maintes manifestations morbides extra-intestinales, caractérisées par la présence de grands amas de spirochètes.

On connaît bien les spirochètes respiratoires : la broncho-spirochètose (*bronchite sanglante*) de Castellani, la spirochètose buccale (stomatite ulcéreuse), la spirochètose des abcès gangreneux du poumon, la spirochètose des hémoptoïques, des tuberculeux, etc. On a rencontré également une grande quantité de spirochètes dans les pyorrhées alvéolo-dentaires, dans les amygdalites chroniques, dans les sécrétions superficielles et même dans les couches profondes des végétations génitales, dans les condylomes acuminés et dans les néoplasies papillomateuses, dans les péritonites, dans le noma, dans certaines dermatoses tropicales. On les a encore constatés dans la gangrène spontanée des organes génitaux, dans le catarrhe nasal avec sinusite, dans les balanites et les balano-posthites, dans le framboesia des tropiques en association avec le *Treponema pertenue*, dans le psoriasis, dans les granulomes inguinaux, etc. Dans l'angine ulcéro-membraneuse individualisée par Vincent, ainsi que dans la pourriture d'hôpital et dans l'ulcère phagédénique des pays chauds, les masses de spirochètes associées au Bacille fusiforme (*B. hastilis*, Seitz) atteignent parfois des proportions si considérables, qu'elles constituent une caractéristique frappante de ces processus morbides spéciaux.

Cette association fuso-spirochètosique a été aussi observée chez le chien, le chat et le singe. Récemment, Delamare, Saïd Djemal et Achitouv (1) ont décrit des cas de spirochètoses cæcales chez les cobayes atteints de scorbut expérimental, accompagné d'hémorragies profuses dans l'estomac et le cæcum.

Chez l'homme, les spirochètoses intestinales présentent un caractère cosmopolite, c'est-à-dire qu'elles sont communes à tous les pays et à tous les climats ; cependant elles se rencontrent

(1) Scorbut expérimental, mélæna et spirochètose cæcale. *Bull. de l'Ac. de Méd.*, 8 avril 1924.

avec une fréquence particulière dans les régions chaudes. Dans les régions tempérées elles prédominent pendant la saison estivo-automnale, et, généralement, elles disparaissent lorsque l'hiver survient.

Parmi les causes prédisposantes ont attiré l'attention, d'une manière particulière, les troubles de l'appareil digestif, surtout ceux qui sont dus à une mauvaise alimentation. C'est pour cela peut-être, que l'on a pu signaler, avec une fréquence notable, des spirochètoses intestinales au cours de la dernière guerre, car les dyspepsies gastro-intestinales devaient alors être fréquentes parmi des masses d'individus insuffisamment alimentés ou soumis à des fatigues épuisantes.

Tous les auteurs s'accordent dans l'affirmation que les spirochètes des déjections présentent un polymorphisme déconcertant.

Dans les selles ils acquièrent des aspects morphologiques très différents : des formes en S ou des formes semblables au chiffre 3 on passe aux formes spirillaires plus ou moins longues, plus ou moins épaisses, avec des ondulations larges ou étroites, superficielles ou profondes, ou même à peine marquées.

Ce polymorphisme compliqué par certaines propriétés communes considérées comme caractéristiques de ces microbes et, en outre, l'impossibilité de leur isolement en culture pure et de leur cultivabilité dans les milieux nutritifs ordinaires, leur médiocre colorabilité, leur propriété de ne pas prendre le Gram ont rendu extrêmement difficiles la différenciation et la classification des spirochètes.

Même leur nomenclature basée sur la seule observation microscopique, savoir sur les mensurations des pas de spire [Ftchegoïn (1)] ou sur des indices obtenus en divisant la longueur moyenne d'un nombre déterminé de spirochètes par le chiffre moyen de leurs tours de spires [Froilano de Mello et De Andrade (2)], c'est-à-dire une nomenclature basée sur des coefficients d'identification morphologiques nécessairement variables et incertains — est devenue toujours plus compliquée et con-

(1) Présence des Spirochètides dans les crachats hémoptoïques. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 89, p. 1150-1151, 1922.

(2) Spirochètose bronco-pulmonaire au nord du Portugal. *Bull. de la Soc. de Path. exotique*, 15, p. 284-286, 1922.

fuse. Et on a cru même pouvoir la simplifier par l'emploi de formules et de calculs algébriques! [Achitouv (1)].

De cette manière on a effectivement établi un grand nombre de types différents de spirochètes, en se basant surtout sur leur aspect, leur longueur, leur épaisseur, leurs ondulations diverses, la forme présentée par leurs extrémités, etc.

Mais sur ces points aussi les auteurs ne se trouvent pas d'accord.

Delamare (2), dont les études sur ce sujet sont très connues, ne croit point que ces méthodes, particulièrement lorsqu'on les emploie pour des spirochètes polymorphes — et selon moi ces microbes présentent tous du polymorphisme — donnent des résultats numériques d'une régularité constante.

D'autre part, Delamare affirme aussi (3) qu'il est impossible de différencier, par exemple, le *S. bronchialis* de Castellani, considéré comme un germe exotique, du *S. Vincenti*, reconnu comme un germe cosmopolite. Même Vincent croit à l'identité de ces deux micro-organismes (4).

D'autres auteurs déclarent à leur tour que le *S. Vincenti* est identique au *S. buccalis*, hôte habituel de la bouche, décrit par Cohn dès 1875, au *S. eurygyrata* intestinal décrit par Werner en 1909, au *S. Schaudinni* de l'ulcère tropical, décrit par Prowazek en 1907, au *S. minima* rencontré en 1912 au Brésil par Beaurepaire Aragão et Vianna dans une ulcération chronique, au *S. balanitidis* trouvé en 1906 par Hoffmann et Prowazek dans le pus d'une balano-posthite et, enfin, au *S. refringens* rencontré en 1905 dans le smegma préputial et généralement considéré comme un simple saprophyte.

On a aussi identifié le *S. dysenteriae* de Le Dantec avec le *S. eurygyrata*. Brumpt (5) veut même éliminer le *S. subtilis* décrit par Castellani en 1907, le regardant comme probablement

(1) Mensuration des courbures des spirochètes. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 94, p. 1192-1194, 1924.

(2) Au sujet de l'index d'identification morphologique des spirochètes bronchiques. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 8 novembre 1924 et 1^{er} mai 1926.

(3) Sur la distribution géographique des spirochètoses respiratoires, d'après quelques travaux récents. *Bull. de la Soc. de Path. exotique*, 12 mai 1926, p. 322.

(4) Note sur la fuso-spirochètose bronchique. *C. R. de la Soc. de Biologie* 1^{er} mai 1926.

(5) *Précis de Parasitologie*, Paris, Masson, 1922, p. 91.

identique au *S. dentium* signalé par Koch dès 1877; on devrait aussi exclure le *S. microdentium* décrit par Noguchi en 1911 et qui serait considéré identique au *S. buccalis*.

Récemment, Bezançon et Etchegoin (1) ont rapproché le spirochète de la gangrène pulmonaire du *S. bronchialis* de Castellani; Parr (2), à son tour, affirme que tous les spirochètes intestinaux appartiennent au groupe du *S. eurygyrata*, et ainsi de suite.

Quelques auteurs considèrent les trois spirochètes de la série buccale — *S. buccalis*, *S. media* et *S. Vincenti* — comme des formes différentes d'un micro-organisme unique. Ceux de la série intestinale, qui de cinq que l'on avait décrits d'abord, sont devenus sept par les observations de Thomson (3), devraient être réduits à un seul type, analogue à celui de l'angine de Vincent.

On admettrait donc l'existence de deux seules espèces de spirochètes : celle buccale et celle intestinale. Mais, puisque à cause de leur homéomorphisme, les spirochètes intestinaux peuvent être assimilés à ceux de la bouche, et ces derniers, à leur tour, aux spirochètes bronchiques et pulmonaires, on devrait conclure que les spirochètes intestinaux ou cæcaux, aussi bien que les spirochètes respiratoires, appartiennent tous à une souche commune.

Cette question est devenue tellement confuse que, récemment, M^{me} Zuelzer a imaginé de classifier les spirochètes suivant le degré de leur commensalisme ou de leur parasitisme pathologique, au lieu de les considérer au point de vue morphologique.

Il est cependant bien peu probable que même cette proposition puisse avoir une application pratique. On ne peut en effet exclure que, le cas échéant, un spirochète quelconque — comme tant d'autres microbes qui habituellement vivent en saprophytes sur nos muqueuses (colibacilles, pneumocoques, staphylocoques, *proteus*, etc.) — puisse éventuellement passer des conditions de vie saprophytique à l'état d'activité

(1) Spirochètes et gangrène pulmonaire. *Bull. de l'Acad. de Médecine*, 9 février 1926.

(2) Intestinal spirochaetes. *Journ. of Infect. Diseases*, 33, 1923, p. 369.

(3) Some researches on spirochaetes occurring in the alimentary tract of man and some the lower animals. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1914, p. 47.

pathogène. On ne peut, partant, accepter la classification nouvelle.

On n'admet pas, en microbiologie, que les différences de virulence autorisent à créer, classifier ou différencier des espèces microbiennes. Cependant, même en faisant abstraction de tout cela, il resterait encore à résoudre une difficulté préliminaire qui est fondamentale et qui semble, jusqu'aujourd'hui, bien démontrée : celle de l'isolement en culture pure de ces spirochètes décrits par tant de chercheurs qui ont pu les observer seulement au microscope. Pour ce motif on n'a pas eu la possibilité de les étudier plus soigneusement et de les expérimenter dans l'organisme animal.

On sait en effet que, jusqu'à présent, on n'a jamais réussi à isoler ces micro-organismes en cultures vraiment pures. Même les expériences, effectuées chez les animaux au moyen de produits pathologiques ou de cultures plus ou moins impures, ont donné des résultats complètement négatifs.

Seulement, chez l'homme, Onorato a réussi (1) à transmettre, en Tripolitaine, des associations fuso-spirochètosiques provenant de lésions phagédéniques. Il les inoculait sous la peau d'individus en mauvaises conditions de nutrition, sur des blessures traumatiques et sur des tissus doués de faible vitalité. Dans ces circonstances l'auteur aurait obtenu la formation d'ulcères caractéristiques et de processus phagédéniques parfois luxuriants.

Ces observations de Onorato constituent tout ce que nous avons aujourd'hui d'intéressant, du côté expérimental, sur ce chapitre encore si incertain de la microbiologie.

II. — Morphologie et biologie des spirochètes cæcaux.

Ce problème de l'isolement en culture pure des spirochètes intestinaux ou respiratoires a défié, jusqu'aujourd'hui, les procédés les plus ingénieux et les plus patients de la technique bactériologique.

(1) Il fagedenismo da simbiosi spiro-bacillare in Tripolitania. *Archivio Italiano di Sc. Med. Coloniali*, n° 1, giugno 1920.

On doit à Thiroloix et Durand (1) les premiers essais de culture de ces microbes, mais leur succès fut seulement partiel. Ces auteurs, ayant pratiqué l'hémoculture dans un cas d'appendicite compliqué par une pneumonie d'origine septicémique, réussirent à cultiver un spirochète dans le sérum et dans le liquide pleural de la même patiente. Mais la culture se montra toujours contaminée par la présence d'un bacille associé qu'on n'avait jamais pu éliminer.

Successivement Sangiorgi (2) et, plus tard, Delamare et Achitouv (3) ont réussi à obtenir et à conserver longtemps des spirochètes, en ensemençant de la matière fécale dans l'eau peptonée ou en bouillon ordinaire additionné de sérum inactivé de cheval, et en présence d'une atmosphère d'hydrogène sulfuré. Mais les cultures de ces auteurs se montrèrent, elles aussi, contaminées par la présence d'autres bactéries qu'ils n'avaient pu éloigner.

Onorato, dans son mémoire que nous avons cité plus haut, fait mention de cultures pures de *Bac. Le Danteci* et de *Spir. Vincenti*, qu'il aurait obtenues en Tripolitaine à l'aide d'un procédé tout à fait spécial et fort compliqué. Mais des descriptions extrêmement sommaires contenues dans son travail, on a l'impression que ses cultures n'étaient pas plus pures que celles obtenues par ses prédécesseurs. Entre autres, elles exhalaient une odeur fétide. Or, les cultures vraiment pures des spirochètes intestinaux ne dégagent pas cette odeur, comme nous le verrons plus loin.

Récemment, Bezançon et Etchegoin (4), en employant un milieu liquide, constitué par du sérum de cheval, de l'eau peptonée et de la solution physiologique, ont réussi à faire développer et à repiquer en série les spirochètes des crachats hémoptoïques des tuberculeux. Malheureusement, ces cultures aussi restèrent toujours contaminées par la symbiose tenace

(1) Spirochétémie au cours d'une appendicite aiguë. Hémoculture et séro-culture. Isolement et culture du parasite, etc. *Bull. et Mém. Soc. méd. des Hôpitaux de Paris*, 2 juin 1911, p. 775.

(2) Sulla cultura in vitro degli spironemi dell'intestino umano. *Pathologica*, 15 febbraio 1917.

(3) Spirochètoses intestinales. *Ann. de Médecine*, 1924, p. 328.

(4) Cultures des spirochètes des hémoptysies tuberculeuses. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 24 avril 1926.

d'autres microbes que l'on ne pouvait supprimer par aucun moyen.

Delamare (1), dans sa revue critique déjà mentionnée plus haut, dit que M^{me} Hogue aurait réussi à obtenir, par un procédé fort compliqué, des « souches pures » de *Spirochaeta eurygyrata* (2). On lit la même chose dans la revue analytique de Saenz (3).

Ces auteurs ont été évidemment induits en erreur par le titre quelque peu suggestif que M^{me} Hogue a donné à son mémoire. Si l'on a recours en effet au texte original de ce mémoire, on relève que M^{me} Hogue n'a jamais isolé des « souches pures » de spirochètes intestinaux. Comme tant d'autres auteurs elle a cultivé des spirochètes associés à d'autres microbes. M^{me} Hogue apprêtait des gouttes pendantes d'une culture impure de matière fécale où s'étaient aussi développés des spirochètes. Lorsqu'elle croyait avoir trouvé une petite goutte contenant un seul spirochète, elle l'ensemait dans un nouveau tube de liquide nutritif. De cette manière elle obtenait une culture nouvelle — très impure —, mais la considérait comme la culture mère d'une souche (... *the beginning of a pure line; i. e. a line derived from a single individual*), dérivée sûrement de l'individu séparé et ensemencé. Voilà la signification de la « souche pure » de M^{me} Hogue.

D'ailleurs, des recherches successives accomplies par Parr (4) dans le but de contrôler les succès partiels de M^{me} Hogue restèrent « sans résultats ».

On comprendra mieux tout cela plus loin, lorsque nous verrons que l'ensemencement d'un seul ou même d'un nombre limité de spirochètes dans un milieu qui n'est pas constitué par du sang défibriné n'a pas de chances de réussir.

J'ajouterai enfin que, même les expériences que ces auteurs ont effectuées chez les animaux, à l'aide de leurs cultures impures, n'ont abouti à aucun résultat positif.

Je dois à des circonstances absolument imprévues la fortune singulière qui m'a permis, au cours de cette année, d'isoler deux

(1) *Loc. cit.*

(2) *Spirochaeta eurygyrata*. A note on its Life, History and Cultivation. *Journ. of Exper. Medicine*, 1922, p. 617.

(3) *Loc. cit.*

(4) Intestinal spirochaetes. *Journ. of Infect. Diseases*, nov. 1923, p. 369.

fois, en culture absolument pure, le spirochète cœcal du cobaye.

Le premier isolement en culture pure de ce spirochète — qui avait été déjà signalé et décrit par moi, il y a trente ans, dans l'intestin du cobaye — eut lieu dans les circonstances suivantes.

Au début de l'hiver dernier j'essayais, pour des recherches spéciales d'autre nature, d'acclimater des cobayes à la température de la chambre-étuve. Je plaçais donc les animaux dans celle-ci, en les y faisant séjourner plus ou moins longtemps et en interrompant leur séjour dans le milieu chauffé par des repos à l'air froid du milieu extérieur.

En employant ces précautions on réussit, peu à peu, à accoutumer les cobayes à demeurer en permanence dans la chambre-étuve, même pendant plusieurs mois de suite. Cependant on ne peut éviter, au cours de la première période de l'acclimatement, la mort de quelques cobayes par coup de chaleur.

Dans ces cas, le tableau bactériologique que l'on rencontre à l'autopsie est toujours celui d'une infection générale due à des microbes de sortie. Ces microbes sont presque toujours les mêmes : on isole le plus souvent le colibacille, mais d'autres fois le germe envahisseur est représenté par le streptocoque ou par le proteus ou même par un bacille anaérobie.

Dans un de ces cas, lesensemencements que j'avais pratiqués avec des prélèvements abondants, faits à l'aide de la pipette, du sang du cœur et du suc des différents organes, semblèrent rester stériles. Je considérai le fait comme un peu étrange et, partant, je gardai quelques jours en observation les tubes ensemencés. Mais aussi au bout d'une semaine on n'y constatait aucune trace de développement de bactéries. Avant de jeter les tubes, je voulus examiner au microscope un gros caillot de sang qui était resté au fond d'un tube de gélose, lui aussi, apparemment stérile. Dans des cas analogues j'avais autrefois décelé la présence de quelques microbes anaérobies. Dans le cas en question je trouvai, tout court, une culture pure de spirochètes !

Évidemment cette fois, chez le cobaye mort dans la chambre-étuve, le germe de sortie avait été un spirochète de l'intestin. Dans cette rare circonstance, ce microbe avait envahi le sang et s'était laissé surprendre et capturer dans le ventricule droit du cœur.

Puisque le spirochète de l'intestin demeure habituellement

dans le côlon et le cæcum, et que sa prolifération normale a lieu surtout dans la cavité cæcale, je crois qu'il est juste de l'appeler « spirochète cæcal ».

J'eus l'occasion plus tard d'observer un deuxième cas, analogue, chez un cobaye que je voulais immuniser avec des cultures vivantes de *Leptospira icteroides* de Noguchi.

Les cobayes inoculés avec ce leptospira dans le péritoine succombent souvent — comme je le dirai mieux dans un autre mémoire — par suite de l'invasion de microbes de sortie. Le *Leptospira icteroides* prédispose énormément aux infections secondaires. En hiver, le microbe qui sort est habituellement constitué par un bacille éberthiforme; en été, c'est le streptocoque qui paraît sur la scène.

Or, un cobaye avait succombé à une série d'injections — peut-être un peu trop rapprochées l'une de l'autre — de *L. icteroides*. L'autopsie avait révélé l'existence d'une gastro-entérite aiguë. Dans le suc splénique abondammentensemencé, avec la pipette, dans deux tubes de gélose, qui étaient ensuite restés plusieurs jours dans l'étuve en des conditions de stérilité apparente, je rencontrai en culture pure, comme dans le cas cité plus haut, le même type de spirochète cæcal, que naturellement je m'empressai tout de suite d'isoler. L'étude ultérieure de cet autre spirochète montra qu'il était complètement identique au premier que j'avais déjà isolé.

Les circonstances de l'obtention de ces deux spirochètes me révélèrent clairement leurs préférences culturales. J'effectuai vite des ensemencements dans des tubes contenant du sang défibriné de cobaye et j'obtins aisément des cultures pures et abondantes de spirochètes, qui m'ont ultérieurement permis de faire une étude systématique et expérimentale de cette intéressante espèce microbienne.

1° CULTURES DANS LE SANG DÉFIBRINÉ.

Le sang de cobaye est le milieu le plus favorable, mais on peut parfaitement se servir même du sang de lapin. Les deux milieux doivent être, cependant, employés aussi frais que possible. Un long séjour dans l'étuve modifie la réaction du milieu

sanguin et le rend moins favorable au développement des spirochètes.

Ces microbes, essentiellement hémophiles, peuvent être ensemencés dans le sang, même en très petite quantité, avec l'anse de platine. Après vingt-quatre heures de séjour dans l'étuve à 37°, le milieu nutritif fourmille déjà de microbes qui présentent l'aspect de vibrions plus ou moins courbés et qui, après mordancage par le Ruge, se colorent assez bien à la fuchsine phéniquée diluée.

Mais au bout de deux autres jours on commence à observer, parmi de petits spirilles ayant la forme d'un S ou du chiffre 3, plusieurs formes spirochétiennes de longueur variable. Pendant les jours suivants, le milieu devient une culture presque homogène, constituée seulement par des spirochètes fort caractéristiques, qui atteignent parfois la longueur de 100 μ et plus. Ils forment quelquefois des buissons gros et touffus, comme de touffes de cheveux et semblables, à différents égards, aux cultures les plus riches de *S. icterohemorrhagiæ* ou de *L. icteroides*.

Mais à partir du cinquième jour, parfois même plus tôt, les spirochètes commencent à présenter leur protoplasma un peu raréfié et moins colorable. Il semble que le filament microbien se vide de son contenu; la lyse commence: c'est-à-dire que s'accomplit le sort rapide réservé à tous les spirochètes. De menus corpuscules apparaissent le long de l'axe, d'une façon rapide, de manière que, en bien peu de temps, parfois en vingt-quatre heures, toute la culture se transforme en une suspension de très petites granulations de dimensions variables, qui ne se colorent pas bien et qui ressemblent à des corps coccoïdes ou à une culture de méningocoques. Toutefois on peut constater, çà et là, des formes spirochétiennes plus ou moins longues et plus ou moins bien conservées.

Ces granulations, transportées dans un autre milieu sanguin frais, peuvent reproduire — comme les granulations des vibrions cholériques — des générations nouvelles de spirochètes, pourvu que la culture mère ne soit pas devenue trop vieille, spécialement à l'étuve. Dans le sang conservé longtemps à la température de 37°, les complexes colloïdaux se modifient et il se forme des acides libres. Ceux-ci provoquent la mort de

la culture, car les spirochètes cæcaux sont très sensibles aux variations de la réaction du milieu.

La conservation à l'état vivant du spirochète cæcal, organisme extrêmement fragile, est très difficile et toujours précaire. Elle constitue une préoccupation constante. Du jour au lendemain, les cultures peuvent mourir ou n'être plus capables de se reproduire. Toute contamination les rend inutilisables, parce qu'on ne réussit par aucun moyen à les purifier. On comprend donc bien la grande difficulté de pouvoir disposer à tout moment de sang défibriné frais et, en même temps, sûrement stérile.

J'ai dit que lesensemencements des spirochètes dans les tubes de sang peuvent être effectués à l'aide de l'anse de platine. Mais si l'on veut ensemençer d'autres milieux nutritifs liquides, l'anse n'est plus suffisante. Les repiquages restent stériles et il faut alors avoir recours à la pipette et ensemençer abondamment plusieurs gouttes de matière spirochétienne. La même nécessité fut constatée par Martin et Pettit (1) pour les repiquages de *Sp. icterohemorrhagiæ*.

L'optimum de température est représenté par 37°, mais on peut obtenir un développement suffisant, quoique plus lent, des spirochètes cæcaux — qui à cet égard ne se montrent pas trop exigeants — même à des températures plus basses. En été, la température du laboratoire suffit à faire développer les cultures.

Après avoir obtenu un développement luxuriant dans le sang défibriné, on peut, par desensemencements abondants, obtenir aussi de maigres sous-cultures en presque tous les milieux nutritifs ordinaires. Cependant, les milieux les plus favorables sont toujours ceux additionnés d'une certaine quantité de sang frais. On ajoute ce dernier, au moyen de la pipette, lors de l'ensemencement. Le liquide nutritif doit, au moins, acquérir une couleur cerise foncée.

2° CULTURES EN MILIEUX LIQUIDES ET DEMI-SOLIDES, CONTENANT DU SANG. FORMATION DE LA MÉLANINE.

A la différence de ce que l'on constate dans les cultures effectuées en sang défibriné, la première apparition des

(1) *Spirochétose ictero-hémorragique*, Paris, Masson, 1919, p. 33.

spirochètes dans le sang dilué, c'est-à-dire en bouillon ou dans l'eau peptonée contenant un peu de sang frais de cobaye ou de lapin, a lieu plus tard, après deux, trois et même plusieurs jours d'étuve.

Les formes initiales sont représentées par de petits spirilles ayant l'aspect du chiffre 3 ou de cédille. Pendant les jours suivants apparaissent les longs spirochètes, très élégants et caractéristiques, qui se massent principalement à la surface du liquide nutritif, en y formant un voile délicat, à peine visible.

Mais aussi, dans ces cultures, la transformation des spirochètes en corps coccoïdes est très précoce. Elle commence dès le sixième ou septième jour. Cependant, les cultures sont encore vivantes et fertiles au bout d'une vingtaine de jours. Durant cette période de temps, la couleur rouge-cerise du milieu devient graduellement brunâtre et les parois des tubes se couvrent d'un voile mince qui, au microscope, se montre constitué par des amas très petits d'hémoglobine. Ensuite, au fur et à mesure que le liquide nutritif se décolore, les parois des tubes deviennent de plus en plus opaques par suite du voile hémoglobinique qui s'obscurcit d'une manière progressive, jusqu'à devenir presque noirâtre et à montrer parfois de vrais éclats métalliques.

L'étude de ce phénomène curieux m'a amené à constater, chez les spirochètes cœaux, une propriété biologique ignorée jusqu'aujourd'hui.

Dans les liquides nutritifs contenant du sang, ces germes produisent, aux dépens de ce dernier, de la mélanine que l'on peut démontrer par la réaction du pyrrol.

On sait que les mélanines sont des produits de condensation et d'oxydation du pyrrol. Chez les organismes vivants, elles sont probablement produites par l'action de certaines diastases. Mais on n'avait pas encore connu leur formation *in vitro*, par l'action directe de micro-organismes.

Pour démontrer la réaction du pyrrol dans les cultures spirochètosiques obtenues en présence de sang, on choisit les tubes de cultures les plus vieux et plus noircis et l'on en recueille tout le dépôt, qui est une sorte de précipité noirâtre, sur de la laine d'amiante, préalablement chauffée au rouge et

ensuite lavée plusieurs fois à l'eau distillée. On sèche le précipité dans l'étuve et on l'introduit, avec l'amianté, dans un petit creuset de quartz que l'on couvre avec une lame de verre, laissant seulement un petit trou latéral pour permettre la sortie des vapeurs. On place le creuset sur une petite flamme à gaz, de façon que la combustion de la matière organique s'effectue lentement, et l'on met une petite écharde de bois de sapin, préalablement plongée dans l'acide chlorhydrique, dans la direction des vapeurs qui sortent. Par l'action de ces dernières, l'écharde acquiert une coloration rouge intense.

C'est la réaction des mélanines.

Dans les tubes stériles de bouillon-sang ou d'eau peptonée-sang, conservés même plusieurs mois dans l'étuve comme témoins, on n'observe aucune trace de noircissement. Ils gardent presque intacte leur couleur primitive donnée par l'hémoglobine, et ne présentent point la réaction des mélanines.

Mais pour la production de la mélanine la présence de l'oxygène est nécessaire.

Si l'on ensemence les spirochètes en tubes de bouillon-sang et qu'on recouvre le milieu de culture d'une couche d'huile de vaseline qui le préserve du contact de l'air, la production de la mélanine n'a pas lieu du tout ou seulement en quantité insignifiante.

Les spirochètes cæaux sont des aérobies facultatifs et, par conséquent, ils supportent même des conditions de vie anaérobie.

Dans les cultures préservées du contact de l'air, ces microbes se développent plus pauvrement et lentement, mais ils y vivent bien plus longtemps. Dans ce cas, le milieu sanguin conserve inaltérée, pendant plusieurs mois de suite, la couleur de l'hémoglobine. Les microbes s'y développent particulièrement en surface, au-dessous de la couche d'huile, formant un voile mince et très délicat, d'une couleur blanc sale, et qui tend à grimper le long des parois, entre le verre et la colonne d'huile, comme pour aller à la rencontre de l'oxygène atmosphérique. Les lambeaux les plus superficiels du voile microbien acquièrent parfois une couleur brunâtre, due à la formation de pigment mélanique. De temps en temps, de petits

fragments de la pellicule superficielle tombent au fond du tube, en y formant un dépôt qui augmente continuellement.

Cependant, dans ces cultures presque anaérobies, les spirochètes se développent d'une manière moins typique, présentant un pléomorphisme marqué, c'est-à-dire des formes anormales ou de dégénérescence. Si on prélève un petit fragment de la pellicule superficielle, ou que l'on aspire, avec une pipette effilée, un peu du dépôt qui est au fond du tube, on peut observer au microscope une infinité de petits vibrions ou de granulations coccoïdes de dimensions variables. On y rencontre même des spirochètes caractéristiques, plus ou moins longs. Mais entre ces formes spirochétiennes typiques et les formes typiquement vibrioniennes ou spirillaires, il existe toute une série de formes intermédiaires très différentes.

Cette tendance marquée à se développer et à se présenter sous les aspects les plus divers, amène à douter sérieusement de la possibilité de baser la classification de ces microbes sur des données morphologiques.

En outre, l'apparition, dans les cultures pures de spirochètes, de formes nettement bacillaires, qui parfois acquièrent même un aspect fusiforme, pourrait faire surgir l'hypothèse d'une origine commune de ces deux formes microbiennes : savoir des bacilles fusiformes et des spirochètes, dans les *associations* dites *fuso-spirochétiennes*.

J'ai dit que dans les cultures presque anaérobies la vitalité des spirochètes dure plus longtemps. En effet, tandis que, dans les cultures aérobies la vitalité cesse au bout de quelques semaines, on peut réussir à pratiquer des repiquages fertiles, même après deux mois, en se servant des cultures anaérobies. Désormais, je donne la préférence à ces dernières, dans le but de conserver longtemps ces micro-organismes très délicats.

Les spirochètes cœcaux se développent assez bien dans le milieu demi-solide de Noguchi. Comme on le sait, ce milieu a la composition suivante :

Sérum frais de lapin.	40 volumes.
Solution physiologique.	80 —
Gélose nutritive à 2 p. 100.	10 —
Hémoglobine de lapin (1 cent. cube de sang défibriné en 3 cent. cubes d'eau distillée) . .	1-2 —

Dans ce milieu, le développement des spirochètes s'effectue à la surface, d'une façon luxuriante, dès les premières vingt-quatre heures, formant des tresses très touffues et faisant virer au brunâtre, dans les couches supérieures, la couleur rosée du milieu. Au bout de trois à quatre jours on observe déjà des spirochètes très longs et caractéristiques. Au bout de six à sept jours, ils commencent à se briser et à subir la transformation granuleuse. Les spirochètes préfèrent sans doute les milieux demi-solides aux milieux liquides.

Dans le but de conserver les cultures sans avoir recours à des repiquages trop fréquents ou au sang défibriné frais, que l'on ne peut pas toujours avoir sous la main, j'emploie ordinairement le milieu de Noguchi ou celui de mon assistant Sette (1); ce dernier milieu nutritif est même plus économique que celui de Noguchi et les cultures y conservent assez bien leur vitalité.

En puisant, à l'aide de la pipette, une bonne quantité de ces milieux riches de spirochètes et en la distribuant dans des tubes de simple bouillon ou d'eau peptonée à 1 p. 100 et en ajoutant, enfin, de l'huile stérile de vaseline, on peut obtenir des cultures presque anaérobies, aussi durables que celles effectuées à l'aide de milieux au sang. Dans ce cas, le mélange gélose-sérum-hémoglobine tombe au fond du tube de bouillon, où il constitue un dépôt mou, floconneux, qui augmente graduellement, représentant à la fin une agglomération luxuriante de spirochètes de toutes formes et de toutes dimensions.

Pour les examens microscopiques en champ obscur, les cultures spirochètiennes dans les milieux demi-solides sont celles qui se prêtent le mieux, parce qu'elles sont très abondantes et denses, spécialement dans les couches supérieures.

Examinés à l'ultra-microscope, les spirochètes se montrent comme des filaments spiralés tellement enchevêtrés, à former de vrais feutres. Ils ressemblent à de gros flocons de neige et rappellent l'aspect des cultures de *Leptospira icteroides* de Noguchi. Toutefois, ces leptospires sont plus grêles, plus déli-

(1) Le milieu demi-solide de Sette a la composition suivante :

Solution physiologique.	120	volumes.
Gélose à 2 p. 100 (Ph 7,5)	15	—
Sérum de lapin	5	—
Bouillon lactosé	10	—
Solution d'hémoglobine	4	—

cats, généralement plus uniformes, avec un pas de spire plus petit et crochus, tandis que les spirochètes cœaux sont plus gros, pas crochus et avec un pas de spire plus large.

Les uns, aussi bien que les autres, se présentent immobiles lorsqu'ils sont réunis en amas. Les individus isolés, qui nagent dans les espaces libres, sont au contraire doués de mouvements de locomotion qui varient selon la phase de développement du spirochète.

Les formes jeunes, courtes, en virgules, ont des mouvements très rapides et traversent le champ obscur avec une agilité comparable à celle des vibrions cholériques qui, de tous les microbes, sont ceux qui ont la vitesse de locomotion la plus grande (1); avec quelques difficultés on réussit à déceler un cil terminal très délicat. Les formes adultes et longues se meuvent, au contraire, plus lentement, par des mouvements sinueux, torpides. Je n'ai réussi à déceler dans ces formes aucun cil. Elles sont rendues immobiles par les solutions de bile de bœuf à 25 p. 100, et sont complètement dissoutes par la bile à 50 p. 100.

Dans les tubes de bouillon lactosé à 2 p. 100, auquel on a ajouté un peu de carbonate de chaux et de sang défibriné, les spirochètes se développent mieux que dans le bouillon de viande. Si l'on examine la culture tous les jours, ayant soin de ne pas la secouer, afin d'éviter le soulèvement du dépôt d'hématics qui s'est formé au fond du tube, on constate que le développement des spirochètes est bien peu abondant dans les couches supérieures du liquide. Ils poussent au contraire très abondamment au fond du tube, en contact immédiat avec les globules rouges. Si on prélève, à l'aide d'une pipette, ce dépôt d'hématics, on constate en effet qu'il est constitué par un dense réseau de spirochètes de dimensions très variables, des formes courtes vibroniennes aux formes très longues spiralées.

Cela confirme les préférences que ces microbes montrent essentiellement pour le sang. Ils appètent les globules rouges, surtout frais et pas trop détériorés, plus que toute autre nourriture. On observe, en effet, que dans les bouillons qui contiennent des globules rouges hémolysés, le développement des spirochètes est insignifiant ou nul.

(1) Sur la vitesse de locomotion du vibron cholérique. Ces *Annales*, 1919, p. 569.

3° CULTURES EN MILIEUX LIQUIDES NE CONTENANT PAS DE SANG.

Toutefois, quand on a obtenu des cultures dans des milieux au sang, il est facile même d'obtenir des sous-cultures en bouillon lactosé, en eau peptonée, dans le lait, dans les sérums de cheval, de lapin, de cobaye, pourvu que les ensemencements soient effectués en dose massive. Les repiquages au moyen de l'anse de platine restent généralement stériles.

Voilà la raison pour laquelle, malgré toutes les ruses expérimentales imaginables, on n'a pas réussi jusqu'à présent à isoler ces spirochètes en culture pure. Ils ne peuvent pas être isolés moyennant des milieux solides et, d'ailleurs, on n'obtient aucun résultat par la méthode de la dilution dans les liquides afin de les séparer de la présence des microbes associés.

Même si l'on réussissait, par la dilution extrême d'un matériel impur — par exemple d'une évacuation fécale, de crachats sanguinolents, de sanie phagédénique — à séparer un seul spirochète, on n'aurait pas encore atteint le but de la capture de ce microbe.

L'ensemencement d'un seul spirochète, au moins dans les milieux nutritifs ordinaires, n'aurait aucune probabilité de donner une culture féconde.

Les *cultures en simple bouillon de viande*, obtenues comme il a été dit plus haut, ne sont cependant pas très luxuriantes. Pendant quelque temps le liquide reste transparent, sans aucune trace de développement. Seulement au bout de deux à trois jours il se forme, au fond du tube, de petits flocons qui ont l'apparence de nuages très délicats. L'examen microscopique y constate de nombreux bâtonnets sinueux et peu de formes spirochéliennes, généralement assez courtes. Ces formes atteignent leur développement maximum au bout de trois à six jours, ce qui coïncide avec un léger trouble du bouillon. Successivement, les spirochètes commencent à subir la dégénérescence et à se transformer en granulations coccoïdes. Dès le neuvième jour on ne voit que quelques formes vibrioniennes; pas de spirochètes, mais de grands amas de sphérules homogènes, semblables à des cultures de microcoques.

A certains égards, l'eau peptonée à 1 p. 100 constitue un

milieu plus favorable que le bouillon de viande au développement des spirochètes cœcaux. Cependant, même dans ce liquide, les spirochètes ne commencent à pousser que deux à trois jours après l'abondant ensemencement. Mais, à côté des formes habituelles de vibrions et de petits spirilles, on observe au fond du tube, entre le deuxième et le quatrième jour, des dépôts floconneux qui renferment de grandes quantités de spirochètes, bien développés, parfois très longs.

Les cultures en eau peptonée se conservent plus longtemps que celles en bouillon de viande. Les spirochètes y gardent leur aspect caractéristique jusqu'au sixième ou septième jour. Mais, à partir du huitième jour, leur phase d'involution commence. Les spirochètes se dissolvent et il ne reste dans la culture que de petits spirilles et des amas de granulations cocciformes.

Le bouillon lactosé à 2 p. 100, additionné d'un peu de carbonate de chaux, constitue un milieu beaucoup plus favorable que le bouillon ordinaire et l'eau peptonée. Mais ces cultures ont une vitalité courte, à cause de la réaction acide que le liquide acquiert en peu de jours.

Au bout de quarante-huit heures la culture est, dans ce milieu, déjà en marche. Le bouillon se montre uniformément troublé et l'examen microscopique révèle des quantités très considérables de petites formes spirillaires, parmi lesquelles on constate assez de spirochètes longs, flexueux et très caractéristiques. Pendant les jours qui suivent les spirochètes augmentent encore leur nombre. Mais bientôt on observe un changement de scène, qui prélude à l'extinction très rapide de la culture. Vers le septième ou le huitième jour, on commence à observer sur les parois du tube un dépôt pulvérulent, très fin, qui rend opaque le verre et qui, au microscope, semble constitué par une quantité énorme de petites bactéries plus ou moins fragmentées et transformées en amas de granulations.

Les spirochètes cœcaux exercent une action fermentative marquée sur le lactose, avec production d'acide lactique. Cet acide, en réagissant sur le carbonate de chaux, forme du lactate de calcium soluble qui, à son tour, provoque la coagulation des spirochètes et leur floculation sur les parois et au fond du tube, où l'on peut toujours observer un dépôt flocon-

neux et comme mucilagineux, constitué par de petites bactéries de dimensions diverses, groupées en amas plus ou moins grands et ne rappelant nullement la forme primitive spirochétienne ou spirillaire.

Evidemment, dans ce cas a lieu un phénomène physique par lequel, peut-être, la chaux provoque la dégénérescence des spirochètes, qui subissent alors une désagrégation et meurent par suite de la réaction acide du milieu. En effet, au bout de neuf jours, le carbonate de chaux, qui se trouvait au fond du tube, n'y existe plus et, à sa place, on trouve un dépôt abondant, blanchâtre, muqueux, constitué par des floculats pleins de formes bactériennes très grêles, presque fragmentées et d'amas de granulations coccoïdes.

L'ensemble de ces observations ne confirme pas seulement la notion de la délicatesse extrême et de la fragilité des spirochètes cæcaux, mais aussi leur grande tendance au pléomorphisme le plus marqué et à l'involution rapide, laquelle se manifeste morphologiquement par leur complète transformation granuleuse.

J'ai déjà dit plus haut que l'on peut obtenir des cultures de spirochètes même dans le lait.

Effectivement, dans le *lait stérilisé* on trouve au bout de quarante-huit heures depuis l'ensemencement de nombreux groupes de formes courtes spirochéliennes. Mais celles-ci ne poussent pas abondamment; on n'observe jamais les formes longues et, après cinq à six jours, la culture meurt par la réaction acide qui survient dans le milieu.

J'ai essayé aussi des sérums.

Dans le *sérum de cheval* les spirochètes se développent lentement, peu abondamment et d'une manière atypique. On y rencontre des formes bacillaires, plus ou moins longues, parfois courbées et en très grande partie conglomerées.

Dans le *sérum dilué* avec de la solution physiologique, spécialement à 1 p. 10, le développement est plus abondant, mais, même dans ce milieu, les spirochètes poussent par groupes et forment des agrégats bacillaires, parmi lesquels on distingue nettement des éléments cocciformes, filamenteux, spirillaires, vibrioniens, etc. Bref, on rencontre un pléomorphisme très marqué et, dans les préparations microscopiques,

on ne réussit jamais à voir des spirochètes vraiment typiques et bien développés semblables à ceux que l'on observe dans le sang défibriné ou dans les milieux de Noguchi et de Sette.

Des essais de cultures, effectués respectivement avec le sérum de lapin ou le sérum de cobaye, soit purs, soit dilués avec du bouillon, de l'eau peptonée ou de la solution physiologique, ne m'ont pas donné de meilleurs résultats.

Un milieu nutritif que l'on peut recommander, non pour la production de cultures abondantes, mais pour leur conservation, est constitué par la *gélatine* ordinaire.

Il faut avant tout noter que les spirochètes cœaux ne poussent pas sur la gélatine solide, à la température du laboratoire. Mais dans l'étuve à 37°, du moins dans la *gélatine liquide*, ils se multiplient, quoique très lentement, d'une manière assez facile et caractéristique.

Déjà deux ou trois jours après l'ensemencement, on commence à observer, suspendus dans la gélatine, de gros flocons presque sphériques, qui semblent nager dans le milieu liquéfié. Ces globules, qui ont l'aspect de houppes de coton, croissent lentement et indifféremment soit dans la profondeur, soit vers la surface du milieu. Si l'on excepte ces globules nageants, opaques et isolés, la gélatine reste d'ailleurs transparente.

L'aspect microscopique de ces amas floconneux montre qu'ils sont constitués par des spirochètes de toute dimension. Au bout des premières quarante-huit heures on commence à constater, comme à l'ordinaire, les formes vibrioniennes, puis les formes spirillaires courtes; au bout de quatre à cinq jours les spirochètes longs, même avec 10 à 20 ondulations, et, plus tard, le début de la transformation granuleuse.

Parfois les spirochètes se développent même en surface et forment une mince pellicule et une collerette adhérente au verre.

Si on laisse encore la gélatine dans l'étuve, les colonies formées par les gros globules et le voile superficiel tombent, à la fin, au fond de la gélatine, en y formant un dépôt où l'on voit, pêle-mêle, des amas de granulations et des formes en virgule ou vibrioniennes. Cependant, la gélatine reste toujours transparente et présente seulement de petits flocons, suspendus çà et là dans le milieu demi-solide.

Mais si l'on ôte la gélatine de l'étuve et qu'on la conserve à la température du laboratoire, les globules restent immobilisés à leur place, dans le cylindre de gélatine qui se solidifie. Si l'on évite l'évaporation, les colonies peuvent de cette manière être conservées, pour des buts démonstratifs, pendant quelques mois de suite. Dans ces cultures en gélatine, les spirochètes survivent longtemps. J'ai réussi à effectuer des repiquages même après deux mois.

Les cultures liquides de spirochètes cæcaux ne dégagent aucune odeur spéciale.

4° CULTURES SUR MILIEUX SOLIDES.

La gélose simple est le seul milieu solide sur lequel j'ai réussi à obtenir des cultures aérobies de spirochètes. L'addition de sang à la gélose ne semble apporter aucun avantage.

Mais il est extrêmement difficile et aléatoire d'obtenir ces cultures. Les ensemencements ordinaires effectués au moyen de l'anse de platine, ou même de la pipette, restent généralement stériles. Seulement quelquefois, quand onensemence plusieurs tubes de gélose, spécialement en se servant de cultures spirochétiennes déjà bien développées en sang défibriné, on réussit à voir dans quelques-uns de ces tubes, après quatre à cinq jours d'étuve — le plus souvent dans les couches inférieures du milieu, même si celui-ci ne renferme pas d'eau de condensation au fond — quelques traces de développement de spirochètes.

Au début, la culture se présente comme de petites colonies rares et isolées qui apparaissent clairsemées à la surface de la gélose, ou comme une collerette opaque, grisâtre, molle, qui suit les bords inférieurs du milieu nutritif.

Ces colonies ont l'aspect de petites gouttes ou de coulages de cire. Elles présentent une surface luisante et une consistance pâteuse et presque muqueuse, mais se dissolvent et se désagrègent vite dans l'eau de condensation. Elles croissent avec une lenteur extrême le long de la strie et ont une tendance minime à se développer en surface. Avec le temps, elles grossissent, deviennent épaisses et presque tuméfiées et lorsqu'elles ont atteint un certain degré de développement, qui n'est

jamais considérable, s'arrêtent définitivement dans leur croissance. D'abord elles montrent une coloration grisâtre sale, mais, peu à peu, quelques-unes d'elles, pas toutes, acquièrent une coloration quelque peu brunâtre, tandis que leur transparence est jaunâtre.

Quand, dans les tubes, il y a de l'eau de condensation, il se forme, proche d'elle, à la surface de la gélose, une sorte de rosée qui, au microscope, se montre constituée de formes vibrionniennes et spirochéliennes, mais atypiques, dégénérées, tuméfiées, gibbeuses, parfois monstrueuses et courbées, ressemblant à des vers à soie. Elles s'écartent tout à fait des formes vibrionniennes et spirochéliennes typiques et normales.

L'examen microscopique des colonies qui poussent dans la partie solide et sèche du milieu montre au contraire, dès les premiers jours, une quantité énorme de spirochètes de toute dimension, mélangés avec une infinité de corps coccoïdes qui sont, évidemment, le produit de la dégénérescence granuleuse des formes spirochéliennes, laquelle commence très précocement. Pendant le séjour ultérieur des cultures dans l'étuve, le nombre de spirochètes diminue progressivement. La transformation granulaire se déroule avec une grande rapidité, et, au bout de huit à dix jours, on ne voit que de grands amas de corps coccoïdes, tandis qu'il ne reste aucune trace de formes spirochéliennes.

Ces corps coccoïdes sont assez caractéristiques. En général ils se colorent bien faiblement par la fuchsine phénique diluée. Observés avec un plus fort grossissement, ils se montrent constitués, en partie, par des granulations ayant un point central qui se colore fortement, et par un halo ou enveloppe externe qui reste au contraire faiblement colorée.

Mais d'autres granulations se colorent d'une façon plus ou moins homogène et alors elles semblent constituées par des amas de microcoques. Parfois ces amas, résultant d'éléments quelque peu déformés ou allongés, apparaissent comme constitués par de très petites bactéries.

Dès le onzième jour on ne trouve plus de traces de formes spirochéliennes et toute la colonie apparaît formée par un énorme conglomerat de granulations. Parfois ces dernières se

montrent disposées en chaînettes qui rappellent celles des streptocoques.

En observant ces préparations, on imagine bien difficilement que ces amas de formes coccoïdes ont pu dériver d'une culture pure de spirochètes.

Et cependant, si l'on ensemence une petite quantité de ces amas dans un tube contenant du sang désfibriné frais, de cobaye ou de lapin, on peut voir, au bout de vingt-quatre heures, qu'ils germent d'une manière régulière et forment, d'abord, des figures vibrioniennes ou en 3 et, ensuite, des figures typiquement spirochétiennes.

Les premières préparations que l'on fait avec cette nouvelle culture montrent tout de suite et clairement la façon dont les spirochètes dérivent des granulations coccoïdes. On voit, en effet, de petits agrégats centraux de granulations, de la périphérie desquels poussent et se détachent des formes vibrioniennes et des filaments spirochétiens plus ou moins longs. Dans ce cas on observe comme l'image d'un petit buisson ou d'un hérisson.

Les spirochètes qui poussent à la surface de la gélose tendent à pénétrer dans la profondeur du milieu. Si on racle, en effet, la culture et qu'on l'enlève complètement, il reste encore visible une empreinte opaque qui s'enfonce dans la gélose et qui, à l'examen microscopique, paraît constituée par des amas de granulations.

Les repiquages d'une culture sur gélose dans d'autres tubes de gélose présentent une réussite incertaine. Ils restent généralement stériles. On obtient seulement quelques résultats positifs lorsqu'on pratique des ensemencements très abondants.

Ayant observé que la bonne réussite de ces repiquages se manifeste de temps à autre, je suppose que la valeur du pH du milieu nutritif exerce une influence décisive à cet égard.

Je n'ai obtenu aucun résultat des tentatives de culture faites sur d'autres milieux nutritifs solides.

En résumé, de l'étude des cultures des spirochètes cæcaux dans les différents milieux nutritifs il ressort clairement que ces microbes, extrêmement délicats et fragiles, aiment plutôt les milieux demi-solides et plus ou moins riches en sang. Cela

explique pourquoi on les rencontre surtout en grande quantité dans les produits pathologiques plus ou moins riches en globules rouges (crachats hémoptoïques, diarrhées sanguinolentes, etc.).

Il y a même quelques auteurs qui supposent que les hémoptysies des tuberculeux porteurs de spirochètes peuvent être provoquées par ces microbes plutôt que par les bacilles de Koch. Ils se basent sur le fait que la disparition des formes spirochétiennes coïnciderait généralement, dans ces cas, avec la cessation de l'expectoration sanguine. A présent, on comprend bien cela, comme pareillement on comprend que si l'on supprime, par un traitement convenable, une diarrhée sanguinolente, cessent en même temps les décharges fécales abondantes de spirochètes.

Les spirochètes montrent une vitalité bien faible, spécialement lorsqu'ils se développent en présence de l'air. Leur transformation granuleuse survient avec une grande rapidité. Cette transformation — ainsi qu'il a aussi été observé chez les vibrions cholériques — ne signifie pas toujours la mort des spirochètes, parce que les granulations coccoïdes sont encore capables de germer et de reproduire des formes spirochétiennes, lorsqu'on les réensemence dans un milieu nutritif très favorable, comme le sang défibriné. Cependant, la transformation coccoïde prélude sans doute à la mort prochaine des spirochètes et à l'extinction de la culture.

J'ai effectué quelques expériences de filtration sur bougies Berkefeld N. et Chamberland L. Seulement dans quelques cas, j'ai pu observer le passage des spirochètes, en ce qui concerne les cultures en bouillon-sang. Mais je ne puis affirmer s'ils traversèrent les filtres sous la forme spirochétienne ou sous celle de granulations.

La vie presque anaérobie facilite au contraire, spécialement dans les milieux demi-solides, la survivance des spirochètes et les fait développer d'une façon plus luxuriante. Par cela, on pourrait, peut-être, expliquer pourquoi, dans la plupart des manifestations pathologiques extra-intestinales caractérisées par la présence de spirochètes, on constate l'association d'autres microbes, comme dans l'angine de Vincent, dans les ulcères phagédéniques, dans la gangrène pulmonaire, dans les végéta-

tions génitales, dans le noma, etc. On trouve toujours les spirochètes dans les couches profondes des tissus malades, tandis qu'à la surface abondent les microcoques et les autres bactéries. Dans quelques néoformations papillomateuses étudiées chez les solipèdes, Carpano (1) a observé que les spirochètes nichés dans les couches les plus profondes des lésions sont presque en culture pure.

On sait que certaines espèces anaérobies peuvent pousser en présence de l'air, seulement parce qu'elles vivent symbiotiquement avec d'autres espèces avides d'oxygène. Cela rappelle à la mémoire une observation intéressante faite par Sangiorgi (2), qui a obtenu le développement en série des spirochètes intestinaux de l'homme, seulement après avoir laissé intact, dans les tubes d'eau peptonée, le voile superficiel constitué par des microbes aérobie, qui mettait les spirochètes en conditions de vie presque anaérobie.

D'ailleurs, on sait bien que ces symbiotes des germes anaérobies ne jouent pas seulement le rôle d'absorber l'oxygène et d'exercer une action réductrice, mais elles produisent aussi des substances analogues aux ferments, qui stimulent le développement des mêmes anaérobies. Quelques auteurs admettent, en effet, que plusieurs micro-organismes sont capables de faciliter, dans l'intestin, le développement des spirochètes.

Les spirochètes cœcaux présentent, au moins dans les cultures artificielles, et même lorsqu'ils se développent dans des milieux identiques, un pléomorphisme si remarquable et si fréquent, que l'on peut bien supposer qu'aussi dans le contenu intestinal — dont la composition, la réaction, la flore microbienne, etc., subissent tant de variations, spécialement dans les états pathologiques — ils peuvent acquérir des formes, des dimensions, des caractéristiques diverses, comme je l'avais déjà constaté dans mon observation de 1895.

Cela posé, il est naturel que l'on doive soumettre à une révision la classification actuelle et la nomenclature des spirochètes, au moins de ceux décrits dans les différentes localisations

(1) Su di alcuni spironemi rinvenuti in neoformazioni papillomatose degli equini. *La Clinica Veterinaria*, 1914.

(2) Sugli spironemi dell' intestino umano coltivati *in vitro*. *Pathologica*, 1^{er} septembre 1917.

nasales, pharyngiennes, laryngiennes, trachéales, bronchiales, alvéolaires, pleurales, appendiculaires, cœcales, sigmoïdo-rectales, etc., car elles sont basées exclusivement sur des données morphologiques relevées seulement à l'aide du microscope, c'est-à-dire basées sur des éléments très variables et incertains : longueur, épaisseur, mouvements, extrémités effilées ou émoussées, spires plus ou moins serrées et plus ou moins profondes, chromophilie, etc.

On ne peut donc exclure la possibilité d'unifier ou, au moins, de simplifier considérablement les nombreux types — ou, mieux, l'excès de types — de spirochètes, spécialement de ceux de l'appareil digestif. On ne peut aujourd'hui éliminer le doute que, dans bien des cas, plutôt que d'espèces diverses, il s'agit de formes que l'on peut réduire à très peu d'espèces, peut-être à une seule, comme les colibacilles, microbes essentiellement entérophiles et extrêmement variables.

Le fait que déjà maints auteurs [Hassenforder (1), Sangiorgi (2), Lebœuf et Braun (3), Luger (4), Waldorp (5), Delamare (6), De Lavergne et Florentin (7), etc.] tendent à admettre que les spirochètes ne sont que des microbes de la bouche transportés mécaniquement dans l'intestin, et que Kritchewsky et Séguin (8) admettent déjà l'unité de souche dans les spirochètoses buccales, nous amène à considérer comme possible une telle simplification.

Il ne serait pas possible, par exemple, de contester la parfaite identité morphologique entre les figures des *spirochètes bronchiaux*, cultivés par Bezançon et Etchegoin à partir des crachats hémoptoïques tuberculeux — et dont les photomicro-

(1) Contribution à l'étude des microbes spiralés de l'intestin et de leur rôle pathogène. *Thèse de Lyon*, 1913-1914.

(2) Lambie e spironemacee nell' intestino umano. *Pathologica*, 15 maggio 1916.

(3) Résultats de l'examen microscopique de 436 selles, etc. *Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 20 octobre 1916.

(4) Spirochäten und fusiform Bazillen im Darm, etc. *Wiener med. Woch.*, 1917, p. 1643.

(5) Spirochètose intestinale *C. R. de la Soc. de Biologie*, 91, 1924, p. 322.

(6) *Loc. cit.*

(7) Fusospirochètose à localisation rectale. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 24 mars 1925.

(8) L'unité des spirochètoses buccales. *Revue de Stomatologie*, 27, 1925, p. 548.

graphies sont reproduites dans la planche qui accompagne la note de ces auteurs publiée dans les *C. R. de la Société de Biologie* du 30 avril 1926 — et les figures des *spirochètes cæcaux* reproduites aux n^{os} 1, 3, 4, 5, 9, 10 et 12 de la planche 1 qui accompagne le présent mémoire.

Il faut néanmoins considérer que, même en admettant l'origine buccale des spirochètes intestinaux — opinion que l'on ne pourrait contester, car les spirochètes ne peuvent naître dans le contenu intestinal par génération spontanée — nous ne devons aucunement accepter l'hypothèse de leur transport purement mécanique et, respectivement, de leur passage banal à travers la muqueuse gastrique. Si l'on tient compte de ce que l'on a même récemment démontré (1) en ce qui concerne les voies que parcourent tous les microbes asporogènes de la bouche pour atteindre les dernières portions du canal digestif, où, effectivement, a lieu une excrétion pariétale continue de bactéries qui proviennent des surfaces muqueuses en communication avec l'extérieur, et si l'on considère encore la sensibilité extrême des spirochètes à l'égard des acides, il paraît évident que le passage de ces microbes, de la cavité buccale au contenu cæcal, ne peut s'effectuer à travers l'estomac, mais seulement par la voie sanguine.

III. — Action des spirochètes cæcaux sur l'organisme animal. Les symbioses spirochètiennes.

Jusqu'à présent, les propriétés pathogènes des spirochètes buccaux, respiratoires ou intestinaux se sont montrées bien peu évidentes et peu concluantes du côté expérimental.

Les expériences effectuées sur des animaux d'espèces différentes par Le Dantec (2), Teissier, Richet et Tanon (3), Delamare (4), Thirollox et Durand (5), Hogue (6) etc., avec des

(1) G. SANARELLI. *Les entéropathies microbiennes*. Paris, Masson, éd., 1926.

(2) *Loc. cit.*

(3) Spirochètes et spirilles dans l'intestin. Condition de leur présence, etc. *Bull. et Mém. Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 2 juin 1911, p. 775.

(4) *Loc. cit.*, p. 340.

(5) Spirochètémie au cours d'une appendicite aiguë, etc. *Bull. et Mém. Soc. méd. des Hôpitaux de Paris*, 25 mai 1911.

(6) *Loc. cit.*

cultures de spirochètes associés à d'autres microbes et même avec des matières fécales spirochétifères, ont donné des résultats négatifs.

P. Mühlens (1), qui a étudié quelques cas de spirochétose intestinale dans le Sud-Est de l'Afrique, n'admet pour ces microbes qu'un rôle purement saprophytique.

Il paraît que seulement les « greffes non stériles » (*innesti non sterili*) effectuées par Onorato (2) chez l'homme, ont donné, dans des circonstances très spéciales, savoir sur des tissus déjà blessés, des résultats positifs, c'est-à-dire des ulcérations de nature phagédénique.

Les partisans de la thèse du pouvoir pathogénique primaire ou autonome des spirochètes affirment cependant que les insuccès de l'expérimentation chez les animaux ne peuvent effacer les résultats qui ressortent de l'observation pratique effectuée chez l'homme.

Mais, à vrai dire, si les expériences de laboratoire n'apportent pas quelque lumière dans ce sujet si obscur, on ne comprend pas comment on peut admettre qu'une espèce microbienne, que l'on rencontre dans les manifestations morbides et spécifiques les plus diverses, aiguës ou chroniques, primaires ou secondaires, de l'homme et des animaux, apparaît douée d'une action tout à fait indifférente et fortuite ou bien d'une activité pathogène multiforme et polyvalente. Il est difficile d'admettre qu'un microbe, dont la présence se rattache à tant de processus pathologiques, se montre comme un agent bon à tout faire ou à ne rien faire !

Partant, après avoir suffisamment étudié la morphologie et la biologie de mon spirochète cæcal que, d'ailleurs, je me garde bien d'identifier avec l'un ou l'autre des spirochètes intestinaux ou gastriques décrits jusqu'à présent, j'ai cru nécessaire de l'expérimenter chez les animaux de laboratoire.

Je dirai tout de suite que les résultats de ces expériences ne sont pas encore fort remarquables, mais ils ont cependant permis de déterminer les propriétés pathogéniques — selon moi bien intéressantes — de ce micro-organisme.

(1) Spirochäten bei Menschen und Tieren in Tropen. *Deutsche, Militärarzt Zeitschrift f. d. Armee*, 1912, p. 430.

(2) *Loc. cit.*

Il faut dire avant tout qu'on n'a pas la possibilité d'inoculer aux animaux de grandes quantités de spirochètes cæcaux. Les cultures de ce microbe en milieux liquides, même en présence de sang, sont toujours relativement peu abondantes; celles en milieux demi-solides se développent lentement et poussent bien seulement dans les couches supérieures; celles sur gélose se développent d'une façon incertaine, avec une extrême lenteur, n'acquièrent jamais l'aspect luxuriant des cultures bactériennes et dégénèrent très vite. Si l'on veut, par conséquent, inoculer des cultures fraîches, on est forcé inévitablement d'employer des émulsions relativement pauvres en microbes.

J'ajouterai encore que les expériences effectuées chez les souris blanches, chez les rats albinos, chez les chiens et les chats nouveau-nés et chez les singes, ont été entièrement négatives. Au contraire, j'ai obtenu des résultats plus ou moins intéressants, dans les expériences suivantes, effectuées sur les campagnols, les petits cobayes et les petits lapins.

1^o EXPÉRIENCES CHEZ LES CAMPAGNOLS (PYTHIMUS SHAVII).

Les inoculations de spirochètes cæcaux dans le tissu sous-cutané de ces petits animaux très délicats ne donnent pas de résultat. Mais les inoculations intra-péritonéales de 2 cent. cubes d'une culture âgée de trois jours provoquent parfois la mort en deux à trois jours. Cependant cette dernière ne survient jamais par suite d'une multiplication des spirochètes. Dans la cavité péritonéale des campagnols les spirochètes subissent, au contraire, des processus d'involution et une lyse rapide accompagnée d'une phagocytose locale intense.

Il semble toutefois que les protéides mis en liberté par la spirochètolyse favorisent les infections secondaires. En effet, le tableau bactériologique des campagnols qui meurent dans ces cas est toujours celui d'une infection générale par *B. proteus* ou par d'autres bactéries de sortie.

On ne réussit à obtenir des cultures de spirochètes ni avec le sang, ni avec les organes.

2^o EXPÉRIENCES SUR LES COBAYES.

J'ai employé des cobayes nouveau-nés, de 60 à 80 grammes chacun. Les cobayes qui ont atteint une centaine de grammes ne peuvent déjà plus servir; ils sont complètement insensibles aux spirochètes cœcaux.

Les injections intra-péritonéales de 4 à 5 cent. cubes de cultures récentes en bouillon-sang amènent parfois la mort qui peut survenir après quelques heures (seize à dix-huit) aussi bien qu'au bout de quelques jours (cinq à six).

Dans le premier cas, on rencontre à l'autopsie les signes d'une entéro-péritonite d'intensité moyenne, avec une réaction marquée de l'épiploon, mais avec une sérosité péritonéale peu abondante. On y constate une grande quantité de spirochètes. On réussit même à voir ces micro-organismes dans le liquide pleural, le sang et le contenu un peu diarrhéique de l'intestin grêle, où, évidemment, ils ont été expulsés par la voie de la muqueuse. On peut donc supposer que, dans ces cas, a eu lieu une multiplication des spirochètes qui, ensuite, ont été déversés dans le courant sanguin.

On obtient, en effet, des cultures pures en ensemençant le sang du cœur. Les cultures de l'exsudat péritonéal sont, au contraire, le plus souvent impures. Je n'ai jamais pu obtenir de passages en série en inoculant de cobaye à cobaye la sérosité du péritoine. Le nombre de spirochètes contenus dans les quantités peu abondantes de cet exsudat que l'on rencontre à l'autopsie est insuffisant. On constate donc ce qui a lieu aussi lors du cas des vibrions cholériques. On sait qu'il n'est pas possible de rendre virulents les vibrions dans l'organisme des cobayes au moyen de passages en série ni directement de péritoine à péritoine. Généralement, les petits cobayes inoculés avec des sérosités péritonéales, même si ces dernières sont riches en spirochètes, survivent. Quelquefois ils meurent au bout de vingt-quatre heures avec les signes d'une légère entéro-péritonite, mais sans que les spirochètes aient pu se multiplier.

Lorsque la mort des cobayes survient au bout de plusieurs jours, elle est due exclusivement à quelques microbes de

sortie; le plus souvent au streptocoque, déchaîné par le léger processus initial entéro-péritonéal.

En résumé, l'action pathogène des spirochètes chez les cobayes nouveau-nés est bien peu évidente. On constate rarement chez ces animaux une réelle multiplication des spirochètes. Le plus fréquemment ces microbes agissent comme le gonocoque, le méningocoque, etc., c'est-à-dire par l'action directe ou indirecte exercée par leurs protéides.

3° EXPÉRIENCES SUR LES LAPINS.

J'ai employé d'abord des lapins très jeunes, pesant environ 400 grammes.

Les injections intra-péritonéales et celles intra-trachéales restent tout à fait inoffensives. Les injections intraveineuses, même d'une grande quantité (5 cent. cubes) de culture en bouillon-sang, ne donnent lieu à aucune infection spirochétosique. Les animaux maigrissent beaucoup, deviennent cachectiques et succombent après plusieurs jours, sans présenter à l'autopsie aucune lésion spéciale. Les cultures révèlent parfois la présence de germes banaux, dus à des invasions agoniques. Les injections sous-cutanées dans le pavillon de l'oreille donnent lieu, ordinairement au bout de trois à quatre jours, à la formation de petits abcès locaux, avec un contenu dense et caséeux.

L'examen microscopique de ce pus ne décèle pas la présence de spirochètes, mais les ensemencements en bouillon-sang ou sur gélose donnent souvent lieu à des cultures spirochétiennes.

Il est évident que, même dans ces cas, l'action pathogène des spirochètes cæcaux que l'on met en contact avec des *tissus sains* se borne simplement à l'action exercée par leurs protéides plus ou moins toxiques, savoir par leur substance protoplasmique.

Les inoculations dans les testicules de jeunes lapins, pesant environ 1.200 à 1.400 grammes, donnent lieu, d'abord, à une tuméfaction de l'organe, accompagnée d'une légère rougeur du scrotum. Mais au bout de quelques jours tout redevient normal.

Les inoculations dans la chambre antérieure de l'œil provoquent la formation, au bout de deux ou trois jours, d'un petit

ulcère cornéen au point de pénétration de l'aiguille, et d'une irido-cyclite intense avec hyperémie accentuée et tuméfaction de l'iris, mais sans que l'humeur aqueuse devienne apparemment trouble, c'est-à-dire sans qu'il y ait une multiplication appréciable des parasites. En effet, au bout de cinq à six jours l'œil redevient normal. Il reste seulement un petit leucome cornéen.

Mais si, en même temps que l'injection de spirochètes dans la chambre antérieure de l'un des deux yeux, par exemple de l'œil droit, on pratique l'injection d'une petite quantité de staphylocoques pyogènes dans la chambre antérieure de l'autre œil, on assiste à ce phénomène intéressant : au bout de trois jours, l'œil gauche est déjà frappé de panophtalmie purulente, et deux jours après, ce processus de suppuration dure encore, tandis que l'œil droit est déjà guéri de son irido-cyclite spirochétienne.

Au bout de douze à dix-huit jours, alors que l'œil gauche suppuré est devenu presque un moignon, on a la surprise de voir soudainement frappé l'œil droit qui avait repris son aspect normal. On y constate d'abord une iritis violente, bientôt suivie de panophtalmie et de destruction complète de l'organe. Du contenu de l'œil on isole le staphylocoque doré en culture pure. Aucune trace de spirochètes.

De ces cas, qui reproduisent d'une façon si frappante la classique ophtalmie sympathique, ressort bien clairement l'action prédisposante ou de l'appel à distance, exercée par le protéide spirochétien injecté dans la chambre antérieure de l'œil droit, sur les staphylocoques nichés dans l'œil gauche.

Quel que soit le mécanisme de cet appel, il reste démontré que la présence des spirochètes ou de leur protéide favorise dans l'œil la manifestation et le développement d'un processus de suppuration.

Toutefois, il fallait encore savoir si même le cas inverse pouvait avoir lieu, et, pour cela, j'ai effectué des expériences *in vitro* et *in vivo*.

L'action favorisante que le staphylocoque doré exerce sur les spirochètes cæcaux se manifeste d'une manière très évidente *in vitro*.

Si, par exemple, dans une culture en bouillon-sang déjà ense-

mencée, même abondamment, de spirochètes, mais restée — comme parfois il arrive — assez maigre ou presque stérile, on ensemence une anse de staphylocoques, on assiste bien vite, à partir du lendemain, à un développement vigoureux des spirochètes. On dirait que ces derniers accélèrent leur activité de prolifération en présence des staphylocoques, qui agiraient comme de véritables agents catalytiques.

Très probablement les staphylocoques, en privant le milieu nutritif de son oxygène, facilitent la germination et le développement des spirochètes qui, dans certaines circonstances, s'adaptent mieux à un milieu un peu anaérobie. En effet, ils se multiplient abondamment en présence des staphylocoques et montrent des formes très longues, tout à fait caractéristiques.

Si l'on fait des préparations avec le peu de dépôt qui se forme constamment au fond du tube de culture, on observe des touffes spirochétiennes étroitement unies à des amas de staphylocoques.

La symbiose intime et l'attraction réciproque de ces deux espèces microbiennes ne pourraient se montrer optiquement plus démonstratives.

J'ai dit plus haut que les passages des cultures spirochétiennes, de bouillon à bouillon, ne peuvent être effectués quand on ne fait pas les ensemencements avec d'abondantes quantités de microbes, c'est-à-dire à l'aide de la pipette. Les repiquages au moyen de l'anse de platine sont insuffisants et le bouillon demeure toujours stérile.

Or, si dans un tube de bouillon on introduit, à la fois, une anse de staphylocoques et une anse de spirochètes, l'examen microscopique de la culture, déjà bien développée après un séjour de vingt-quatre heures dans l'étuve, révèle, au milieu de staphylocoques, la présence de nombreuses formes courtes de spirochètes. Au bout de quarante-huit heures on y observe aussi des formes longues, en quantités telles qu'elles dépassent parfois le nombre des staphylocoques symbiotes.

Cependant, après trois à quatre jours, ces derniers sont déjà devenus plus nombreux que les spirochètes. Ceux-ci, ayant peut-être atteint leur stade cultural mûr, commencent à présenter les signes d'une involution précoce. En effet, cinq jours après on observe clairement, parmi les formes spirochétiennes

survivantes, très variées, le début de la transformation granuleuse. Au bout de six à sept jours cette transformation est totale et l'on ne trouve plus aucun spirochète. Leurs granules, semblables comme toujours à des corps coccoïdes, se confondent avec les staphylocoques.

On obtient peut-être des résultats encore plus démonstratifs si, au lieu d'ensemencer les deux microbes à la fois, on ensemence les spirochètes dans un tube de bouillon où l'on a introduit, vingt-quatre heures avant, le staphylocoque. Dans ce cas on observe qu'après un séjour de vingt-quatre heures dans l'étuve, la prolifération des spirochètes est déjà très abondante.

Evidemment, les produits du métabolisme déjà formés par les microbes pyogènes, ou les changements survenus dans la constitution physique du milieu nutritif (diminution de l'oxygène, etc.), facilitent l'implantation et la multiplication des spirochètes.

Cependant, on ne peut pas constater le phénomène opposé. En effet, si l'on ensemence une anse de culture spirochétienne dans un tube de bouillon et si, au bout de vingt-quatre heures, on introduit dans le même tube une anse de staphylocoque, on n'observe, pendant les jours suivants, que le développement de ces derniers micro-organismes. Il n'y a aucune trace de multiplication des spirochètes ensemencés auparavant dans le bouillon stérile. Ils ont été détruits ou endommagés tellement qu'ils ne sont plus capables de reprendre leur état primitif et de proliférer, même après l'addition de microbes favorisants.

Sans doute cette action favorisante des staphylocoques envers les spirochètes est réglée par des conditions déterminées. En effet, si les cultures staphylococciques en bouillon sont fraîches, c'est-à-dire de vingt-quatre à quarante-huit heures, les spirochètes que l'on y ensemence se développent très bien et vite. Mais si les cultures staphylococciques sont vieilles de huit à dix jours, les ensemencements des spirochètes restent stériles. Probablement, les cultures sont trop riches en produits du métabolisme staphylococcique ou les milieux sont trop épuisés. A la longue, les changements produits dans le milieu nutritif par les microbes symbiotiques endommagent les spirochètes qui, par conséquent, tendent à disparaître.

Même les repiquages en série, de tube à tube, des cultures cocco-spirochéliennes présentent une certaine limite. Jusqu'au cinquième ou sixième repiquage, les bouillons ensemencés avec l'anse se développent assez bien, mais à partir du septième, les spirochètes commencent à perdre leur vitesse de germination et n'apparaissent dans les cultures qu'au bout de quarante-huit heures. Après le huitième repiquage, ils apparaissent dans le bouillon seulement au bout de trois jours, mais disparaissent presque aussitôt. Par le neuvième repiquage on n'obtient que des cultures staphylococciques; les spirochètes ont perdu toute propriété reproductive.

Cela amène à penser que même l'action favorisante des microbes symbiotiques doit s'exercer sur les spirochètes seulement jusqu'à certaines limites qui ne peuvent être dépassées.

C'est peut-être pour ce motif que dans les ulcères phagédéniques, dans les tissus gangreneux et nécrosés, dans les processus purides et dans tant d'autres manifestations pathologiques, caractérisées par la présence de spirochètes associés à d'autres bactéries, les spirochètes sont rares dans les couches superficielles et moyennes, tandis qu'ils se montrent plus abondants dans les tissus sains et à une distance plus grande des microbes satellites.

Dans ces cas, les spirochètes exerceraient une sorte de rôle d'avant-garde; les autres bactéries constitueraient l'arrière-garde, mais en même temps elles créeraient, par les produits de leur métabolisme et par leur action biochimique, le milieu favorable où les spirochètes peuvent se développer, avancer, battre en brèche et exercer leur action préliminaire d'attaque contre les tissus normaux.

La façon dont se comportent les microbes qui constituent les associations spirochéliques amène à supposer l'existence, chez chaque microbe associé, de propriétés biologiques particulières, lesquelles, singulièrement considérées, ne jouent peut-être aucune action pathogène, mais, se manifestant associées, exercent cette action qui, dans certains cas, est même spécifique.

Certes, seulement quelques espèces microbiennes peuvent jouer le rôle de symbiotes utiles dans les associations spirochétosiques.

Des expériences *in vitro*, analogues à celles que je viens de décrire, m'ont démontré que les streptocoques sont beaucoup moins favorables que les staphylocoques au développement des spirochètes. Par contre, le colibacille et le *B. proteus* exercent une action nuisible à ce développement.

Une action encore plus favorable que celle du staphylocoque est exercée par un certain bacille, à l'aspect banal, isolé, en même temps que le spirochète cæcal, de la sérosité péritonéale d'un petit cobaye qui avait été inoculé avec une culture pure de spirochètes.

J'ai voulu, en outre, étudier l'action de cette symbiose staphylo-spirochétienne chez le lapin.

Si l'on injecte sous la peau d'un jeune lapin 1 cent. cube d'une culture staphylococcique en bouillon, il apparaît, au bout de quelques jours, une tuméfaction locale qui, au bout d'autres six à sept jours, s'ulcère. Mais, le pus évacué, l'ulcération tend à se restreindre peu à peu et, après une vingtaine de jours, elle est complètement guérie.

Si, au lieu d'injecter au lapin une culture de staphylocoques seulement, on injecte une culture associée de staphylocoques et de spirochètes, même de troisième ou de quatrième repiquage, mais riches en formes spirochétiennes, l'animal meurt souvent en vingt-quatre heures avec le tableau anatomique d'une entérite cholériforme. Dans ce cas, toutes les anses intestinales, extrêmement distendues et marbrées de sang, présentent un contenu diarrhéique jaunâtre, muqueux, semblable à celui que l'on observe dans le choléra expérimental.

L'examen microscopique du sang et du tissu cellulaire sous-cutané au siège de l'injection ne révèle pas la présence de spirochètes, mais le contenu diarrhéique de l'intestin montre une très grande quantité de spirochètes minces et élégants, se présentant, particulièrement en certains endroits, comme des cultures pures.

On doit observer que, parmi les animaux de laboratoire, le lapin — à la différence de la souris, du rat et du cobaye — se montre exempt de spirochètes intestinaux.

Dans ces cas, les cultures du sang ou des différents organes ne révèlent pas la présence de staphylocoques. Ces microbes ne sont décelés qu'au point de l'inoculation. Au contraire, on

peut obtenir des cultures de spirochètes, en se servant du suc hépatique et, parfois, de celui de la rate. L'urine se trouve toujours albumineuse.

Il n'existe donc aucun doute que dans ces cas se manifestent de véritables entérites spirochètiennes, d'origine hématogène, provoquées par une infection mixte, où les spirochètes seuls s'exaltent et exercent une action pathogène décisive.

Même si on ne les rencontre pas dans le tissu cellulaire sous-cutané, les spirochètes qui y ont été inoculés pénètrent dans le courant sanguin, atteignent et frappent à revers les parois entériques ou, peut-être, se multiplient et, en tous cas, où ils produisent une entérite aiguë.

En effet, on réussit parfois — comme il a déjà été dit plus haut — à cultiver en état de pureté des spirochètes en se servant des organes internes ; mais toutes les cultures du contenu entérique en bouillon, en eau peptonée et dans le liquide de condensation des tubes de gélose, révèlent toujours un développement abondant de spirochètes mêlés avec des colibacilles.

Cela démontre, contrairement à ce que suppose L.-W. Parr (1), que les spirochètes, peut-être même les spirochètes de la bouche — que quelques auteurs veulent identifier avec ceux de l'intestin — peuvent exercer, le cas échéant, un rôle actif et important dans la pathogénie des entérites.

Du reste, la facilité avec laquelle la virulence des spirochètes développés en symbiose avec les staphylocoques s'exalte, peut être démontrée même par d'autres expériences.

Les injections de ces cultures symbiotiques dans les veines des lapins n'amènent à aucune conclusion démonstrative. Elles tuent les animaux par septicémie staphylococcique pure en vingt-quatre heures seulement. Mais, si on pratique l'injection dans la rate en employant le procédé très simple que j'ai décrit dans mon récent mémoire sur le charbon interne (2), on a des résultats bien différents.

Il faut d'abord savoir que l'injection de 1 cent. cube de culture staphylococcique dans le parenchyme splénique du lapin provoque toujours la mort de l'animal en sept à huit jours

(1) *Loc. cit.*

(2) Sur la pathogénie du charbon dit interne ou spontané. Ces *Annales*, 1925, p. 209.

avec le tableau bien connu de la pyohémie : amaigrissement extrême et infarctus suppurés dans les reins. Si, au lieu de pratiquer l'injection intrasplénique avec les staphylocoques seulement, on injecte 1 cent. cube de culture mixte staphylococcospirochétosique, la mort du lapin survient au bout de quarante-huit heures, par suite d'une infection générale, aiguë et mixte, due au staphylocoque et au colibacille.

Il est bien vrai que, dans ces cas, les spirochètes ne disparaissent pas. On ne les rencontre pas seulement dans la rate, mais aussi dans le contenu de l'intestin grêle et dans les cultures obtenues de ces organes. Mais les staphylocoques et les colibacilles, microbes de sortie, sont ceux qui prédominent.

Il résulte donc clairement que si l'on peut observer dans certaines circonstances expérimentales une exaltation de l'activité pathogène des spirochètes par l'action d'autres microbes, dans d'autres cas il est probable que par l'action des spirochètes a lieu une exaltation de la virulence des microbes associés.

C'est, en effet, aussi ce qu'on observe quand, pour aider le développement local des spirochètes, on injecte dans la trachée ou dans la cavité pleurale de petits cobayes 1 cent. cube de culture spirochétienne mêlée avec 1 cent. cube de sang défibriné.

Même pas dans ces cas on n'observe de traces de développement des spirochètes; mais les animaux meurent souvent avec des lésions pulmonaires par suite d'une infection générale provoquée par des streptocoques, germes de sortie. Seulement à l'examen microscopique du contenu de l'intestin grêle quelque peu diarrhéique, on décèle la présence d'un certain nombre de spirochètes.

Des tentatives analogues, faites en injectant sous la peau des cultures spirochétiennes additionnées de sang, ont toujours donné des résultats semblables. Au bout de quelques jours, il se manifeste au point d'inoculation une petite escarre à laquelle fait suite un abcès et, souvent, la mort de l'animal en huit à dix jours. Mais l'examen microscopique du contenu de l'abcès ne révèle jamais la présence de spirochètes, et à l'aide des cultures effectuées avec le pus de l'abcès pendant la vie de l'animal, aussi bien qu'avec le sang prélevé dans le cœur à l'autopsie, on n'obtient que des streptocoques.

En résumé : on réussit à cultiver à l'état de pureté les spirochètes du tube digestif. Il s'agit, probablement, de microbes d'origine buccale, très fragiles, très difficiles à cultiver et à entretenir et presque dépourvus d'action pathogène spécifique. Ils trouvent, spécialement dans le contenu normal du gros intestin de l'homme et des animaux, des conditions particulièrement favorables à leur implantation et à leur développement.

Comme les vibrions cholériques et d'autres microbes entérophiles, les spirochètes fécaux apparaissent doués d'un certain tropisme intestinal. On ne peut donc exclure leur probable intervention active chez l'homme dans la production d'entéropathies aiguës ou chroniques, non entérogènes, mais d'origine hématogène ou, mieux, stomatogène ; ce que, du reste, on doit admettre pour l'origine de toute entérite de nature microbienne.

D'ailleurs, selon ce qui ressort des expériences de laboratoire, l'action des spirochètes s'exercerait principalement par un pouvoir toxique direct dû à leur protéide, comme dans le cas des gonocoques et des méningocoques.

Si des conditions pathologiques surviennent dans le milieu intestinal, avec une augmentation des matières protéiques et, surtout, avec la présence de sang, il est évident que les spirochètes, microbes non seulement entérophiles, mais aussi hémophiles, doivent y rencontrer de meilleures conditions de vie et de prolifération.

Leur apparition massive et insolite dans les selles de l'homme ne peut, en conséquence, avoir que la valeur séméiologique de conditions anormales du gros intestin provoquées par une cause quelconque.

Toutefois, ils sont et restent principalement comme des parasites commensaux inoffensifs ou des symbiotiques. Voilà, très probablement, leur rôle véritable lorsqu'ils réussissent à s'implanter et à proliférer. Mais cela n'exclut point que, en contact avec des tissus altérés ou devenus par une cause quelconque peu vitaux, ou bien lorsqu'ils se trouvent associés à certains microbes favorisants, spécialement protéolytiques, ces commensaux banaux exaltent leurs propres activités biologiques et agissent comme de véritables parasites pathogènes, ou au moins comme des microbes qui ne sont pas tout à fait indifférents.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I.

- FIG. 1-7 : Culture de *spirochètes* *cœcaux* de trois jours en sang défibriné de cobaye.
- FIG. 8 : Culture de sept jours en sang défibriné de cobaye.
- FIG. 9 : Culture de quarante-huit heures en eau peptonée-sang.
- FIG. 10 : Culture de quatre jours en eau peptonée-sang.
- FIG. 11 : Culture de quarante-huit heures en eau peptonée-sang.
- FIG. 12 : Culture de trois jours en eau peptonée-sang.
- FIG. 13-14 : Culture de quatre jours en eau peptonée-sang.
- FIG. 15 : Culture de sept jours en eau peptonée-sang.
- FIG. 16 : Culture de huit jours en eau peptonée-sang.
- FIG. 17 : Culture de cinq jours sur gélose.
- FIG. 18 : Culture mixte de vingt-quatre heures, en bouillon, de microcoques et de spirochètes.
- FIG. 19 : Contenu de l'intestin grêle de lapin, mort vingt-quatre heures après l'injection sous-cutanée d'une culture mixte de staphylocoques et spirochètes. Présence de beaucoup de spirochètes.
- FIG. 20 : Liquide de condensation d'un tube de géloseensemencé vingt-quatre heures auparavant avec le contenu diarrhéique de l'intestin du lapin précédent. Présence de plusieurs spirochètes.
- FIG. 21 : (a et b). Culture de dix jours, en gélatine, à 37°.
- FIG. 21 : (c). Culture de douze jours, sur gélose, à 37°.

PLANCHE II.

- FIG. 22 : Culture de vingt-quatre heures en sang défibriné de cobaye.
- FIG. 23 : Culture de quatre jours en eau peptonée.
- FIG. 24 : Culture de quatre jours en eau peptonée.
- FIG. 25 : Culture de quinze jours en gélatine à 37°.
- FIG. 26 : Culture de quatre jours sur gélose-sang.
- FIG. 27 : Culture de quatre jours sur gélose.
- FIG. 28 : Culture de cinq jours sur gélose.
- FIG. 29 : Culture de six jours sur gélose.
- FIG. 30 : Culture de sept jours sur gélose.
- FIG. 31 : Culture de quatorze jours sur gélose (seulement des granulations).
- FIG. 32 : Exsudat péritonéal de cobaye nouveau-né, dix-huit heures après l'injection péritonéale de 4 cent. cubes de culture de spirochètes en bouillon-sang.
- FIG. 33 : Spirochètes qui se sont développés pendant trois jours en liquide de Noguchi, observés à l'ultra-microscope.

NOTA : L'impression lithographique imparfaite ne fait pas ressortir dans toute leur évidence et ne rend pas avec une suffisante netteté les dernières figures de la planche II.

POUVOIR PATHOGENE DU VIRUS RABIQUE FIXE

par A. C. MARIE.

(*Institut Pasteur.*)

Le virus fixe, obtenu à la suite d'un certain nombre de passages du virus des rues par le cerveau du lapin (1), a pour caractère essentiel de donner la rage, non seulement par injection intra-cérébrale, mais par inoculation dans la chambre antérieure. La durée de l'incubation peut augmenter ou diminuer (2), suivant les races de lapins utilisées, suivant leur poids, suivant les doses injectées, aussi en raison d'autres circonstances complexes et difficiles à préciser; mais, ce qui paraît inattendu, c'est de voir le virus fixe cesser spontanément de donner la maladie dans les conditions où il la donnait auparavant. Ce sont les faits suivants de cet ordre qui nous ont conduit à étudier à nouveau le pouvoir pathogène du virus fixe de l'Institut Pasteur, tel qu'il se trouve dans le bulbe de passage, ainsi que dans les moelles servant aux vaccinations.

1° En 1923, Remlinger (3) montre qu'à l'Institut antirabique de Tanger, les moelles de quatre et même de trois jours correspondent, au point de vue de leur virulence, à celle du sixième jour des premiers temps de la méthode pastorienne: les trépanations avec les moelles des sixième et cinquième jours n'ont jamais donné la rage; quant à la moelle du quatrième jour, 15 expériences ont fourni 7 résultats positifs et 8 négatifs; il s'agit d'un virus fixe de provenance parisienne et ayant dépassé 2.200 passages.

(1) Nous avons montré (*C. R. Soc. Biol.*, 62, 1907) qu'en passant par le cerveau du chien, le virus des rues se transforme également en virus fixe.

(2) Le Fèvre de Arrie et Tchang Kouo-Ngen (*C. R. Soc. Biol.*, 90, p. 980) ont observé une incubation de cinq jours, après trépanation, soit environ trois-quatre jours de moins que ce qu'on observe avec le virus fixe parisien, d'où provient pourtant le virus utilisé par ces savants.

(3) *C. R. Soc. Biol.*, 89, p. 1082 et 1132.

2° Ce n'est pas tout, et Remlinger constate des différences d'action de la glycérine, cette substance laissant perdre en sept-huit jours toute virulence à des moelles des deuxième et troisième jours, alors que dans les premières expériences de Roux et de Calmette, le pouvoir conservateur de la glycérine se manifestait pendant environ un mois. La dessiccation préalable est de nature à diminuer la durée de conservation dans la glycérine, et cela d'une façon plus accentuée avec le virus fixe qu'avec le virus des rues (1).

3° A l'Institut antirabique de Rome, le virus fixe utilisé était, en 1922, à son 1.850^e passage par le lapin : il provenait d'un virus fourni en 1889 par l'Institut antirabique de Naples, lequel l'avait reçu de Paris. Jusqu'en 1919, Puntoni (2) constate que ce virus fixe a conservé son pouvoir pathogène par injection intra-oculaire chez le lapin ; mais, en 1921, il s'aperçoit qu'il a perdu presque complètement sa virulence lorsqu'il est inoculé dans l'œil, et ne la manifeste plus que par injection intra-cérébrale. Cette mutation dans la virulence devait être mise à profit à l'Institut de Rome, où le traitement antirabique chez l'homme est intensifié depuis cette époque.

Il était intéressant de rechercher si le virus fixe de l'Institut Pasteur avait subi ce que Puntoni appelle une mutation, c'est-à-dire avait, comme celui de Rome, perdu le pouvoir de donner la rage par inoculation intra-oculaire chez le lapin. A vrai dire, l'emploi de ce virus pour les épreuves de ce genre n'avait guère manqué d'être fait au cours des nombreuses expériences d'immunisation que nous avons réalisées, mais étant donné le caractère brusque et inattendu de ces modifications du pouvoir pathogène, il était indiqué de rechercher à nouveau s'il n'avait pas changé. Or, quelque temps avant, ainsi que plusieurs mois après la publication du travail de Puntoni, nous avons eu l'occasion d'observer que le virus fixe de Paris n'avait rien perdu de son pouvoir pathogène par injection dans la chambre antérieure chez le lapin.

Voici l'une de ces expériences d'épreuve intra-oculaire :

(1) *C. R. Soc. Biol.*, 90, p. 70.

(2) *Ann. d'Igiene*, 32, avril 1922, p. 253.

Lapin n° 4	Rage au seizième jour.
Lapin n° 2	Rage au seizième jour.
Lapin n° 3	Rage au dix-septième jour.
Lapin n° 4	Rage au vingt et unième jour.
Lapin n° 5	Rage au vingt-cinquième jour.
Lapin n° 6	Rage au vingt-septième jour.
Lapin n° 7	Mort cachectique au quatrième mois.

Pour chacun de ces animaux, nous prenions soin de projeter d'abord sur le globe oculaire un jet d'eau bouillie, avant de déposer sur la conjonctive quelques gouttes d'une solution stérilisée de chlorydrate de cocaïne au dixième. Trois ou quatre minutes après, l'aiguille très fine était introduite à la limite du limbe cornéen jusqu'au centre de la chambre antérieure, d'où quelques gouttes d'humeur aqueuse s'écoulent, et que l'on remplace par quelques gouttes seulement (0 c. c. 15) de l'émulsion de virus fixe au dixième, fraîchement extrait de l'organisme. Grâce à ces précautions de propreté, et à cette dose faible de virus, nous avons toujours évité les accidents susceptibles de provoquer la fonte purulente de l'œil, et qui viennent fausser les résultats de l'expérience.

Ces résultats, obtenus avec le virus fixe de l'Institut Pasteur, après injection dans la chambre antérieure chez le lapin, ne diffèrent pas de ceux qu'a toujours fournis ce mode d'infection, depuis l'obtention de ce virus fixe. A en juger par ces expériences, on ne trouve pas que ce virus, lequel a subi plus de 1.300 passages, présente quelque mutation dans son pouvoir pathogène pour le lapin.

Il était indiqué de rechercher aussi l'état de la virulence dans les moelles utilisées pour les vaccinations chez l'homme : nous rappellerons que le traitement antirabique, à Paris, est commencé par des injections de moelle du cinquième jour.

Nous avons donc procédé à une série de trépanations, chez le cobaye, espèce plus sensible que le lapin, en partant de la moelle du *sixième* jour jusqu'à celle de un jour. Les tronçons médullaires avaient été immergés pendant huit jours dans la glycérine, au sortir de l'étuve où ils avaient été soumis à la dessiccation pendant le nombre de jours voulu.

Voici les résultats :

COBAYES	INJECTIONS INTRA-CÉRÉBRALES des moelles	RÉSULTATS
N ^o 1	De un jour.	Rage le neuvième jour.
N ^o 2	De un jour.	∞
N ^o 3	De deux jours.	Rage le onzième jour.
N ^o 4	De deux jours.	Rage le onzième jour.
N ^o 5	De trois jours.	Rage le neuvième jour.
N ^o 6	De trois jours.	Mort le lendemain.
N ^o 7	De quatre jours.	Rage le onzième jour.
N ^o 8	De quatre jours.	Rage le onzième jour.
N ^o 9	De cinq jours.	Rage le onzième jour.
N ^o 10	De cinq jours.	Mort le lendemain.
N ^o 11	De six jours.	Rage le neuvième jour.
N ^o 12	De six jours.	Mort de cause inconnue.

La lecture de ce tableau conduit aux remarques suivantes :

1^o Chez un animal aussi sensible que le cobaye, la moelle du sixième jour est virulente par injection intra-cérébrale, comme elle l'était chez quelques animaux, dans les premiers temps des vaccinations pastoriennes. Mais nous insistons sur l'importance du choix de l'espèce animale; ainsi, chez le lapin, J. Viala (1) n'a pas pu donner la rage en inoculant dans le cerveau la moelle de six jours.

2^o La virulence n'est pas toujours conforme à l'âge des moelles, ainsi qu'on l'avait remarqué déjà (cobaye n^o 2).

3^o Lorsque le virus contenu dans les moelles a conservé son pouvoir infectant, on n'observe pas, au moins chez une espèce comme le cobaye, de prolongation notable de l'incubation, en rapport avec l'âge des moelles; ainsi, on voit dans ce tableau que la moelle d'un jour a donné la rage en neuf jours, et celle du sixième jour en neuf également. De plus, le passage du cerveau du cobaye tué en neuf jours par la moelle du sixième jour a donné la rage en huit jours à un autre cobaye, semblablement trépané; la différence d'incubation, pour les deux animaux, était donc insignifiante. Ce fait est contraire à ce qui se passe avec le lapin chez lequel, ainsi qu'il résulte des très anciennes expériences de Gamaléia, l'incubation de la rage augmentait sensiblement avec l'âge des moelles.

(1) Communication orale.

SUR LES CONDITIONS DE L'AGGLUTINABILITÉ DES MICROBES ET DU PHÉNOMÈNE DE L'AGGLUTINATION

(ÉTUDE FAITE SUR *BR. MELITENSIS* ET *BR. ABORTUS*) [1]

par M. BÉGUET.

On sait que certaines souches de *Br. melitensis* possèdent, outre l'agglutinabilité par les sérums de fièvre ondulante ou les sérums expérimentaux, un certain degré d'agglutinabilité par les sérums normaux ou de malades atteints d'affections autres que la fièvre ondulante. Burnet (2) a montré récemment que tous les *Br. melitensis* peuvent être agglutinés par les acides et que les souches agglutinables par les sérums non spécifiques sont agglutinées par le chauffage à 90° quand elles sont en suspension dans l'eau physiologique. Enfin on a souvent signalé une agglutination spontanée chez certaines souches, ce phénomène étant plus marqué dans les cultures anciennes.

Nous avons étudié l'agglutinabilité de 52 souches de *Br. melitensis* et *Br. abortus* (3) en les soumettant à l'action de la chaleur en eau physiologique, à l'action des acides, des bases, des sérums non spécifiques et des sérums spécifiques, ainsi que les actions favorisantes ou empêchantes à l'égard de ce phénomène.

VARIABILITÉ DES DIVERSES AGGLUTINABILITÉS SUIVANT LES SOUCHES.

Des cultures de quarante-huit heures sur gélose de ces 52 souches sont mises en suspension dans l'eau physiologique, par raclage des colonies microbiennes.

1. Une note préliminaire a été présentée à l'Académie des Sciences, séance du 26 juillet 1926, par M. Béguet. « Sur le mécanisme de l'agglutination (à propos du *Br. melitensis*) ».

2. ET. BURNET, Sur la notion de *paramelitensis*. *Arch. Institut Pasteur de Tunis*, 14, juillet 1925, pp. 247-263.

3. Ces souches provenaient de l'Afrique du Nord, de Malte, des laboratoires de Miss Evans, du Michigan agricultural College, du Lister Institute, et du laboratoire de recherches d'Alfort.

Les *Br. abortus* se sont toujours comportés comme les *Br. melitensis*.

A. Si on soumet ces suspensions à la température de 90° , suivant la technique de Burnet, on constate une agglutination plus ou moins complète et plus ou moins rapide suivant les souches. Totale en un temps variant de quelques minutes à deux heures chez les unes, cette agglutination n'est que partielle au bout de plusieurs heures chez les autres, avec tous les intermédiaires. Mais on peut avec Burnet considérer certaines souches comme très agglutinables par la chaleur et d'autres comme pratiquement non agglutinables par la chaleur.

B. Si on ajoute à ces suspensions un acide quelconque (par exemple 1 goutte d'acide acétique à 1/10 pour XIX gouttes de suspension), on observe une agglutination variable, après un temps plus ou moins long, avec de grandes différences suivant les souches.

C. Si on ajoute à ces suspensions une base quelconque (par exemple 1 goutte de lessive de soude à 1/100 pour XIX gouttes de suspension), on observe une agglutination variable, comme pour les acides, mais avec des différences faibles suivant les souches.

D. Si on ajoute à ces suspensions un sérum non spécifique (sérum de malade atteint de suppuration chronique par exemple) à 1/20, 1/50 et 1/100, on observe une agglutination variable suivant les souches, et certaines souches ne sont pas agglutinées.

E. Si on ajoute à ces suspensions un sérum expérimental antimelitensis ayant un pouvoir agglutinant élevé, on constate encore une agglutination variable suivant les souches, mais toutes sont agglutinées.

Le classement de ces souches établi par la rapidité d'agglutination en eau physiologique à 90° est le même que celui établi par l'agglutination par les acides et par les sérums non spécifiques.

Le classement établi par l'action des sérums spécifiques est sensiblement inverse, au moins pour les extrêmes, avec des variations pour les intermédiaires.

Le classement établi par l'action des bases est différent des deux premiers.

MODIFICATION DE L'AGGLUTINABILITÉ
PAR FILTRATION SUR NOIR ANIMAL.

A. Si on filtre sur noir animal une suspension en eau physiologique d'un *Br. melitensis* très agglutinable par la chaleur, on obtient, dans des conditions qui varient suivant le pouvoir adsorbant du noir utilisé, une nouvelle suspension qui n'est plus agglutinable par la chaleur ni par les sérums non spécifiques et qui n'est presque plus agglutinable par les acides. Cette suspension est encore agglutinable par les bases. Le même résultat peut être obtenu en agitant la suspension avec une quantité suffisante de noir animal, et en la débarrassant ensuite du noir par une centrifugation de quelques minutes.

Cette nouvelle suspension étant centrifugée, on remet les corps microbiens en suspension dans le liquide clair provenant de la centrifugation d'une suspension du même *melitensis* n'ayant pas subi l'action du noir animal. L'agglutinabilité par la chaleur, les sérums non spécifiques et les acides reparaît, mais à un degré beaucoup plus faible que dans la suspension origine.

Le liquide clair floccule lui-même par la chaleur, les acides, les bases et les sérums non spécifiques.

On peut renforcer la floculation du liquide clair ou l'agglutination, par la chaleur, les acides, les bases et les sérums non spécifiques, des corps microbiens que l'on y met en suspension, en concentrant ce liquide clair par évaporation dans le vide, à la condition d'employer une suspension en eau distillée, et de la ramener après concentration au taux de l'eau physiologique par addition de chlorure de sodium. Ce liquide est alors flocculé par tous les sérums normaux à 1/20.

On peut rendre agglutinable extemporanément par la chaleur, les acides et les sérums non spécifiques, un *melitensis* qui ne l'est pas et ne l'a jamais été, en le mettant en suspension dans un liquide clair suffisamment concentré provenant de la centrifugation de la suspension d'un *melitensis* possédant à un haut degré cette agglutinabilité.

§. Si on filtre sur noir animal un *melitensis* quelconque de telle façon que tous les corps microbiens restent eux-mêmes adsorbés

sur le noir et que le liquide filtre limpide, ce filtrat est nettement floculable par les bases.

On peut déduire de ces expériences que l'agglutinabilité non spécifique des *melitensis* est due à la floculation de substances péri- et intermicrobiennes qui agissent sur les corps microbiens comme l'albumine agit sur les fins précipités dans le collage des vins. Ces substances sont bien extérieures aux corps microbiens puisqu'on peut les fixer par adsorption sur le noir animal. Elles sont bien normalement adsorbées sur les corps microbiens puisque la centrifugation ne suffit pas à les en séparer complètement, et que le liquide clair obtenu par centrifugation possède toujours une floculabilité beaucoup plus faible que la suspension origine.

La substance qui flocule par la chaleur, les acides et les sérums non spécifiques est très adsorbable par le noir animal, et la substance qui flocule par les bases ne l'est pratiquement pas, tout au moins avec les échantillons de noir animal que nous avons utilisés.

Pour ce qui concerne la substance qui flocule par les bases et qui se trouve dans toutes les cultures de *melitensis*, on peut penser que c'est elle qui flocule dans les vieilles cultures sous l'influence de l'ammoniaque que ces cultures produisent toujours à la longue. La suspension de ces corps microbiens ne peut alors être homogène et ce serait la cause de l'agglutinabilité dite spontanée.

B. Si on arrête à temps l'action du noir animal, juste assez pour que la suspension devienne inagglutinable par la chaleur, la suppression de cette agglutinabilité non spécifique s'accompagne d'une augmentation de la sensibilité aux sérums spécifiques.

En faisant acquérir par le procédé indiqué plus haut l'agglutinabilité par la chaleur, on diminue au contraire la sensibilité aux sérums spécifiques, et le liquide clair concentré provenant d'un *melitensis* agglutinable par la chaleur rend moins agglutinable, par un sérum expérimental antimelitensis, le *melitensis* que l'on y met en suspension, le phénomène étant d'autant plus net que le liquide est plus concentré.

La substance qui flocule par la chaleur en eau physiologique,

par les acides et par les sérums non spécifiques, possède donc un pouvoir empêchant pour l'agglutination par les sérums spécifiques, quand elle est en proportion suffisante.

C. Si on traite par le noir animal un *melitensis* d'une catégorie non agglutinable par la chaleur, en suspension dans l'eau distillée, que l'on centrifuge la nouvelle suspension, que l'on concentre dans le vide le liquide clair et qu'on le ramène au taux de l'eau physiologique à 7 gr. 5 p. 1.000, par addition de chlorure de sodium, on obtient un liquide qui floccule par les sérums spécifiques (phénomène de Kraus renforcé). Ce liquide floccule nettement sous l'action des bases, mais ne floccule pas sous l'action de la chaleur, ni des acides, ni des sérums non spécifiques.

Dans cette expérience nous avons toujours été gênés par la réapparition possible, sous l'influence de la concentration, du pouvoir empêchant de la substance flocculant par la chaleur, la filtration sur noir animal pouvant en avoir laissé passer des traces. D'autre part, une filtration prolongée sur noir animal finit par faire baisser la sensibilité aux sérums spécifiques, surtout si le noir animal utilisé possède un pouvoir adsorbant considérable.

Le pouvoir adsorbant du noir animal étant sensiblement le même pour les corps bactériens eux-mêmes que pour la substance donnant l'agglutination spécifique, et étant donné les difficultés que nous venons de signaler, nous n'avons pas pu réaliser pour l'agglutination spécifique les expériences de suppression et de transfert de la substance présumée, comme pour l'agglutination non spécifique.

D. Qu'il s'agisse d'un *melitensis* très agglutinable ou d'un *melitensis* peu agglutinable par la chaleur, le liquide clair obtenu par centrifugation d'une suspension en eau distillée est toujours modifié lorsque l'on pousse très loin la concentration dans le vide. On finit par distinguer nettement une augmentation de la viscosité, et la flocculation se produit sans autre cause, peu avant la dessiccation complète. Si on centrifuge ce liquide ainsi flocculé par concentration, le nouveau liquide clair obtenu ne possède plus aucune flocculabilité.

ACTION DE LA CHALEUR SUR LE PHÉNOMÈNE DE L'AGGLUTINATION.

Si l'on met à part le phénomène de Burnet où l'élévation de la température est, par définition, la cause même de la réaction, on voit que la chaleur a une action favorisante très nette sur l'agglutination par les acides, les bases, les sérums non spécifiques et les sérums spécifiques, dans certaines limites déterminées pour chaque expérience.

Pour les acides et pour les bases, on voit que l'agglutination est d'autant plus rapide que la température est plus rapprochée de 100°.

Pour les sérums non spécifiques, l'expérimentation est vite arrêtée par la thermolabilité du pouvoir agglutinant du sérum lui-même (Nègre et Raynaud), qui apparaît lorsqu'on prolonge pendant plusieurs heures le séjour à 40° aussi bien que si l'on expose le sérum à 56° pendant trente minutes. Néanmoins on peut voir une augmentation de l'agglutination par un sérum non spécifique de 0° à 37°.

Pour les sérums spécifiques dont le pouvoir agglutinant est thermostable on peut suivre l'augmentation de l'intensité du phénomène jusqu'à la limite de stabilité du sérum lui-même. On voit ainsi qu'à 56° l'agglutination est beaucoup plus nette et à un taux beaucoup plus élevé qu'à 37° (fait déjà signalé par Weill pour d'autres microbes).

En ce qui concerne le mécanisme de l'action de la chaleur, on peut supposer que la pression osmotique de la substance floculable et par suite son ionisation (Loeb) baisse lorsqu'on élève la température, tout au moins dans les limites de l'expérience. Des mesures de résistivité électrique (1) effectuées sur des suspensions en eau distillée de *B. melitensis* agglutinable par la chaleur, à divers degrés de température entre 20° et 100°, nous ont montré que la conductibilité du mélange eau distillée + *melitensis* est plus grande à 20° que la conductibilité de l'eau

1. Les mesures de résistance, qui permettent d'apprécier la conductibilité, ont été faites par la méthode générale du pont de Wheatstone alimenté par un alternateur à fréquence musicale, l'effet capacité des électrodes plongeant dans le liquide étant annulé à l'aide d'une bobine de self-induction (mesures effectuées par M. le professeur Véraïn, professeur de physique industrielle à la Faculté des Sciences d'Alger).

distillée seule. A la température de l'ébullition, l'augmentation de la conductibilité du mélange eau distillée + *melitensis* est beaucoup moins marquée que l'augmentation de conductibilité de l'eau distillée seule. Si on fait la même expérience sur une suspension de *melitensis* en eau physiologique, on fait la même constatation à 20° : le mélange est plus conducteur que l'eau physiologique seule, mais dès la température de l'ébullition et avant que l'agglutination ne soit visible, la conductibilité est nettement moins élevée pour le mélange que pour l'eau physiologique seule à la même température.

On peut déduire de ces expériences que la chaleur fait baisser l'ionisation, et par conséquent la pression osmotique, des substances apportées par les colonies microbiennes dans la suspension, le phénomène étant beaucoup plus marqué en présence du chlorure de sodium. Cette baisse de la pression osmotique sous l'influence de la chaleur est observée pour un grand nombre de protéines, et elle aboutit à un minimum de solubilité qui correspond à la floculation (Loeb).

MODIFICATION DE L'IONISATION DU MILIEU

PAR L'ACTION DES SELS NEUTRES, DES ACIDES ET DES BASES.

L'agglutination par la chaleur ne se produit pas en eau distillée (Burnet) pas plus que l'agglutination par les sérums non spécifiques (Lemaire, Partearroyo). Le phénomène peut se produire dès qu'on ajoute du chlorure de sodium, ou des traces d'acides ou de bases. On peut substituer au chlorure de sodium un autre sel, le chlorure de potassium ou de magnésium, le sulfate de sodium ou de magnésium, le nitrate de sodium ou de potassium.

Nous avons pu faire apparaître l'agglutinabilité par la chaleur en eau distillée, par addition de glucose, mais en en ajoutant une proportion beaucoup plus considérable que de chlorure de sodium (la solution de glucose est beaucoup moins ionisée que les solutions de sels neutres).

Si on ajoute des traces d'acides ou de bases, l'action favorisante est d'autant plus énergique qu'il s'agit d'acides ou de bases plus forts, c'est-à-dire plus ionisés.

Si on augmente la proportion d'acide ou de base, on atteint

une concentration qui fait disparaître le pouvoir agglutinant non spécifique (pouvoir qui serait analogue au pouvoir de la chaleur), cette concentration n'étant pas suffisante, à la température de l'expérience, pour provoquer l'agglutination par la propre action de l'acide ou de la base. Enfin, en augmentant encore la proportion d'acide ou de base, on arrive au degré de concentration qui, à la température de l'expérience, correspond à l'agglutinabilité de la suspension témoin.

L'agglutination spécifique se produit en eau distillée, mais elle est d'autant moins sensible que l'eau est mieux distillée, et elle est plus forte dans l'eau distillée additionnée de traces de substances ionisées et dans l'eau physiologique, qui est ionisée par le chlorure de sodium.

En ce qui concerne l'action générale des sels neutres, des acides et des bases dans le phénomène de l'agglutination, on peut déduire de ces constatations qu'ils agissent en modifiant l'ionisation du liquide de la suspension, c'est-à-dire, par rapport à la substance floculable cause de l'agglutinabilité, en modifiant l'ionisation du liquide intermicellaire. C'est un fait établi dans l'étude des solutions colloïdales que leur stabilité est modifiée par l'addition de solutions ionisées de même signe que les ions extérieurs de la micelle (Duclaux).

MODIFICATION DE L'IONISATION DU MILIEU PAR L'ACTION DU FORMOL.

Si on ajoute 1 p. 100 de solution commerciale de formol à 40 p. 100 à une suspension en eau physiologique de *melitensis* très agglutinable par la chaleur, on fait disparaître cette agglutinabilité. L'agglutinabilité par les sérums non spécifiques disparaît presque totalement à partir de 25° en présence d'une même proportion de formol. On ne peut pas dans ce cas étudier l'action du formol à des températures supérieures à 37°, à cause de la baisse sensible du pouvoir agglutinant non spécifique du sérum lui-même. Mais on peut voir que l'agglutination par les sérums spécifiques, qui n'est pas sensiblement modifiée à 25°, disparaît à 50° en présence de 1 p. 100 de formol.

L'action empêchante du formol à l'égard des phénomènes de l'agglutination est une simple action de présence, comme l'action favorisante des corps ionisés, car les *melitensis* formolés

même pendant un mois, centrifugés, puis lavés et remis en suspension dans l'eau physiologique, redeviennent agglutinables par la chaleur, de même que des *melitensis* en eau distillée, donc non agglutinables par la chaleur, acquièrent cette agglutinabilité dès qu'on ajoute une quantité suffisante de chlorure de sodium, ou si on les remet en suspension après centrifugation dans une solution suffisamment ionisée.

En mettant de côté l'action possible du formol sur la substance floculable elle-même, action que nous n'avons pu étudier, on peut voir que le formol diminue la conductibilité électrique et par conséquent l'ionisation de l'eau ou des solutions dans lesquelles on l'ajoute. Cette diminution est d'autant plus sensible, surtout pour l'eau physiologique, que la température est plus élevée et que le formol employé est plus pur.

A l'inverse des sels neutres, des acides et des bases qui favorisent l'agglutination en ionisant le liquide de la suspension, le formol paraît l'empêcher en diminuant l'ionisation de ce liquide.

*
* *

Les conditions que nous venons d'étudier paraissent communes aux Brucella et à d'autres microbes.

De nombreux microbes autres que les *Br. melitensis* sont agglutinables sous l'action de la chaleur en eau physiologique, ainsi que l'a montré Burnet. Il est intéressant de constater qu'un de ceux qui possède au plus haut degré l'agglutinabilité par la chaleur, la bactériidie charbonneuse, possède aussi à un degré très élevé l'agglutinabilité par les sérums non spécifiques (Lambotte et Maréchal). Les conditions d'ionisation du milieu sont également applicables à l'agglutination de la bactériidie charbonneuse et on peut constater la même action empêchante du formol. D'une façon générale, on retrouve signalés par la plupart des auteurs qui se sont occupés de la question, l'utilité du chlorure de sodium et le rôle de la température dans le phénomène de l'agglutination.

CONCLUSIONS.

Les phénomènes d'agglutination des suspensions microbiennes sont dus à la floculation de diverses substances bactériennes, en

partie adsorbées sur les corps microbiens, en partie diffusées dans le liquide. Cette floculation se produit dans des conditions qui varient suivant la concentration de ces substances, la température de l'expérience et l'ionisation du liquide de la suspension.

Ces conditions sont sous la dépendance des lois générales de la stabilité des solutions colloïdales.

Pour ce qui concerne le *Br. melitensis*, on peut mettre en évidence :

1° Une substance floculable par la chaleur en eau physiologique, par les acides et par les sérums non spécifiques, et dont on peut débarrasser la suspension par adsorption sur noir animal. Cette substance paraît être une production superficielle du microbe, ainsi que le pense Burnet. D'autres espèces microbiennes la produisent aussi.

2° Une substance floculable par les bases, dont on peut constater facilement la présence, même après l'action du noir animal.

3° Une substance floculable par les sérums spécifiques, substance purement bactérienne, propre au genre *Brucella*, qui passe en partie dans le liquide à la faveur d'un équilibre de membrane chaque fois que l'on met le microbe en suspension. La floculation de cette substance est empêchée par une concentration suffisante de la substance floculable par la chaleur.

En résumé, on peut concilier l'hypothèse de Paltauf (1) ou plus exactement la conception de Ch. Nicolle (2) qui mettait à la base du phénomène de l'agglutination une substance issue du microbe et restant pour la plus grande partie au niveau de la membrane, et l'hypothèse de J. Bordet (3) qui faisait de l'agglutination une modification dans les attractions moléculaires, réunissant les éléments entre eux ou avec le liquide ambiant.

(Institut Pasteur d'Algérie.)

1. PALTAUF. *Wiener klin. Wochenschrift*, 1897.

2. CH. NICOLLE, Recherches sur la substance agglutinée. *Ces Annales*, 12, n° 3, mars 1898, p. 161.

3. J. BORDET, Mode d'action des sérums préventifs. *Ces Annales*, 10, n° 4, avril 1896, p. 192; Mécanisme de l'agglutination. *Ces Annales*, 13, n° 3, mars 1899, p. 223.

L'ACTION DU LAIT SUR LE SYSTÈME HÉMOLYTIQUE

par GEORGES SP. JOANNIDÈS.

(*Institut Pasteur hellénique.*)

Dans un précédent travail (1) nous avons montré que le lait semblait se comporter comme anatoxigène vis-à-vis des toxines diphtérique et tétanique. Le fait que certaines substances anatoxigènes (formol) exercent également un pouvoir anticomplémentaire nous a incité à rechercher comment le lait se comporte vis-à-vis du système hémolytique et sur quels éléments de ce système il pourrait agir. Sans vouloir ici chercher à expliquer les relations qui peuvent exister entre le pouvoir anticomplémentaire et anatoxigène d'une substance, nous nous contenterons d'exposer le résultat de nos expériences.

Pour ces expériences nous nous sommes servi :

1° De lait de vache frais. Afin de stabiliser le lait nous l'avons chauffé au bain-marie, en le maintenant pendant cinq minutes à la température du bain-marie bouillant. Après refroidissement nous filtrons le lait sur coton stérile pour le débarrasser de ses plus gros flocons.

2° De sérum de vache inactivé et *non dilué*. Le sérum de cheval nous a donné les mêmes résultats.

3° De sérum de cobaye frais et *non dilué*, qui sera dans la suite désigné comme *alexine*.

4° De sérum hémolytique antimouton, *non dilué*.

Pour avoir à travailler avec des volumes bien mesurables, tout en éliminant le facteur eau qui aurait modifié la consistance du lait, nous avons auparavant titré notre sérum hémolytique et trouvé la dose minima, qui lysait 0 c. c. 1 de globules de mouton en présence de 0 c. c. 1 d'alexine. Pour nos expériences nous avons doublé la dose hémolytique minima.

(1) G. Sp. JOANNIDÈS, Le lait substance anatoxigène? *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 93, 1925, p. 1210 et *Archives de l'Institut Pasteur hellénique*, 1, nos 3-4, 1926, p. 293.

TECHNIQUE. — Nous stérilisons une série de petits tubes et de pipettes. Pour comparer l'action du lait à celle de l'eau physiologique et à celle du sérum, nous disposons les tubes en trois groupes. Chaque groupe comprend trois tubes *a*, *b*, *c*. Dans chaque tube du premier groupe nous versons 3 cent. cubes d'eau physiologique. Dans chaque tube du second groupe nous versons 3 cent. cubes de sérum. Enfin dans chaque tube du troisième groupe nous versons 3 cent. cubes de lait. Dans chacun des trois tubes *a* (du premier, second et troisième groupe) nous ajoutons 0 c. c. 1 d'alexine. Dans chacun des trois tubes *b* nous ajoutons 0 c. c. 1 de globules sensibilisés. Nous avons préparé ces globules en mélangeant, quinze minutes auparavant, au volume voulu de globules le volume correspondant de sérum hémolytique. Dans chacun des trois tubes *c* nous ajoutons 0 c. c. 1 de globules neufs (non sensibilisés).

Après avoir bien agité tous les tubes nous les plaçons à 37°. Au bout d'une heure nous ajoutons à chacun des trois tubes 0 c. c. 1 de globules sensibilisés, et nous plaçons encore ces tubes à 37° pendant une demi-heure. Tous les autres tubes sont centrifugés, et les globules se déposent au fond des tubes en une couche compacte. En renversant ces tubes nous nous débarrassons du liquide, tout en retenant les globules. Dans les tubes *b* et *c* du troisième groupe, le lait, après la centrifugation, se couvre d'une couche de crème, qu'il faut dilacérer à l'aide de l'anse, avant de renverser ces tubes. Les tubes ne contiennent donc que leur dépôt de globules. Dans chaque tube *b* nous ajoutons 0 c. c. 1 d'alexine. Dans chaque tube *c* nous ajoutons 0 c. c. 1 d'alexine et la dose correspondante de sérum hémolytique. Cette dose d'hémolysine est ajoutée sous le volume de 1-2 cent. cubes d'une dilution convenable. Enfin le contenu de tous ces tubes est complété à 3 cent. cubes avec de l'eau physiologique. Après avoir bien agité les tubes, nous les plaçons à 37° et les y laissons une demi-heure. Après ce dernier séjour à 37°, nous centrifugeons tous les tubes des trois groupes, pour évaluer plus facilement le volume des globules qui n'ont pas été lysés.

RÉSULTATS. — *Tubes a* : Le tube *a* du premier groupe (eau

physiologique-alexine, globules sensibilisés) et celui du second groupe (sérum) présentent une hémolyse complète. Le tube *a* du troisième groupe (lait) ne présente pas d'hémolyse. Tous les globules se trouvent déposés au fond du tube.

Tubes b : Le tube *b* du premier groupe (eau physiologique-alexine, globules sensibilisés, alexine) présente une hémolyse complète. Le tube *b* du second groupe (sérum, globules sensibilisés, eau physiologique, alexine) et le tube *b* du troisième groupe (lait) présentent une hémolyse presque complète. Quelques rares globules se retrouvent déposés au fond des tubes.

Tubes c : Les tubes *c* des trois groupes (eau physiologique, sérum ou lait, globules neufs, eau physiologique, alexine, sensibilisatrice) présentent une hémolyse incomplète.

CONCLUSIONS.

De ces expériences nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Que le lait de vache et le sérum, seuls, n'exercent pas une action lytique sur les globules rouges de mouton ;

2° Que le sérum, comme milieu ambiant, n'empêche pas la production de l'hémolyse dans le système hémolytique antimouton ;

3° Que le lait de vache, comme milieu ambiant, inactive complètement le système hémolytique antimouton ;

4° Que cette action « inactivante » du lait s'exerce surtout sur l'alexine.

Le mécanisme de cette action inactivante du lait nous échappe. Ce n'est pas, tout simplement, comme substance colloïdale, que le lait empêche l'hémolyse, puisqu'un autre colloïde, le sérum, ne l'empêche pas.

ESSAIS DE CULTURE PURE DE *TRICHOMONAS INTESTINALIS*

par le Dr C. J. SCHUURMANN

et A. SCHUURMANN TEN BOHKEL STUININK.

L'importance de la culture des Protozoaires intestinaux serait plus grande si l'on pouvait supprimer la culture des bactéries associées. Il est vrai que Chatton [4, 5] a réussi, en 1918, à isoler, par hasard, du sang d'un Gecko, un *Trichomastix* provenant de l'intestin de cet animal et par cela même en a obtenu la culture pure. Mais un tel hasard n'a pas la valeur d'une méthode d'isolement qui assure le succès. C'est pour trouver cette méthode que nous avons effectué les expériences suivantes dont les résultats, quoique le but ne soit pas atteint, sont néanmoins intéressants parce qu'ils montrent dans quelle direction il ne faut pas chercher la solution de ce problème vraiment difficile.

BIBLIOGRAPHIE. — Lynch [2] cultiva les *Trichomonas buccalis* et *vaginalis* dans du bouillon acide,ensemencé avec un peu de mucus; Ohira et Noguchi [3] ont préconisé un mélange de liquide ascite et de solution de Ringer à parties égales; Boyd [8] ajoutait 1 cent. cube d'extrait de selles à 9 cent. cubes d'eau physiologique et trouvait que ce milieu était particulièrement favorable pour conserver le *Trichomonas* de quarante à soixante-cinq jours. Boeck [11, 23] a cultivé des flagellés dans un mélange de 4 à 9 parties de solution de Locke avec une partie de sérum humain. Chatton [5, 6, 7] cultive le *Trichomastix* en bouillon additionné d'organes en autolyse aseptique, ou en bouillon-sang avec une couche d'huile de vaseline, ou dans l'eau de condensation d'un tube de gélose NNN. Roque [14] emploie un milieu tout à fait analogue à celui qu'emploie Boeck pour la culture des amibes, mais préparé avec la solution de Locke et stérilisé à l'autoclave. Popoff [33] considère que la culture dans des sacs de collodion a un certain

avantage et Misas Fanale, enfin, cultive le *Pentatrichomonas* dans le milieu suivant : NaCl 0,47, citrate de soude, sérum de Löffler 0,5, blanc d'œuf 2 cent. cubes, eau distillée 100 cent. cubes, dans lequel les bactéries seraient gênées dans leur développement.

CULTURE DU *TRICHOMONAS*. — Ayant à notre disposition les selles d'un dysentérique à *Trichomonas*, nous avons cultivé ce flagellé dans le milieu de Boeck, préparé suivant les indications de Guérin et Pons [49] :

Au contenu d'un œuf, bien mélangé dans un flacon à billes de verre, est ajouté un dixième de volume d'une solution de Ringer, le tout est réparti en tubes et coagulé à 75° pendant vingt minutes en position inclinée. Ensuite on prépare un liquide ovomucoïde, en ajoutant le blanc d'un œuf à un litre de solution de Ringer et en mélangeant à l'aide de billes de verre. De ce liquide, on ajoute à chaque tube d'œuf coagulé une quantité suffisante pour recouvrir le milieu solide.

Après deux jours, nous avons une bonne culture de *Trichomonas* (+ 20.000 par centimètre cube) qui n'était plus repiquable au bout de quatre à cinq jours à cause des bactéries protéolytiques et des champignons associés.

ESSAIS DE CULTURE PURE. — Avec une culture semblable, Chatton a fait des essais de purification par les méthodes suivantes :

- a) « Vaccination » du milieu nutritif par ensemencement préalable des bactéries seules ;
- b) Addition de sérums anti pour empêcher la culture bactérienne ;
- c) Inoculation de cultures de *Trichomonas* à des animaux vaccinés contre les bactéries associées.

Aucune de ces méthodes ne lui donne un résultat positif.

Nous nous sommes rendu compte que, pour séparer bactéries et *Trichomonas*, la méthode la plus pratique serait d'obtenir la culture des deux sur milieu solide en colonies isolées.

Après de nombreuses expériences préliminaires, nous avons trouvé que la culture du *Trichomonas* en surface est réalisable sur le milieu de Boeck, modifié de la manière suivante :

CULTURE SUR MILIEU SOLIDE. — La coagulation du mélange d'œuf et de solution de Ringer est pratiquée en boîte de Petri et arrêtée dès que le milieu commence à faire prise. Ensuite, on étale une goutte de culture de *Trichomonas*, diluée dans quelques gouttes du liquide ovomucoïde, décrit plus haut, à la surface de ce milieu demi-solide. Enfin, on coule par-dessus de la gélose fondue, mélangée à parties égales avec du liquide ovomucoïde, afin d'empêcher les bactéries de se répandre comme dans un liquide et aussi de présenter au *Trichomonas* une ambiance liquide.

De cette façon, nous avons préparé deux plaques, dont l'une fut encore recouverte d'huile de vaseline.

Après vingt-quatre heures, nous pouvions découvrir des colonies de *Trichomonas* entre œuf et gélose, surtout sur la plaque recouverte de vaseline. Elles se présentaient sous la forme de petites élévations entourées d'une petite rainure circulaire.

En traversant à ce niveau la couche de vaseline et de gélose avec une pipette effilée, on obtenait une petite gouttelette qui apparaissait sous le microscope remplie de *Trichomonas*. En d'autres points, qui ne présentaient pas ces élévations caractéristiques, on ne trouvait que des bactéries ou des flagellés isolés.

Cette expérience fut répétée souvent afin d'examiner plus exactement les conditions de culture en surface. Nos conclusions peuvent être résumées comme il suit :

1° Cette culture ne réussit plus quand on emploie une gélose assez solide pour empêcher effectivement les bactéries de se répandre au-dessous. Il semble bien que le *Trichomonas* ne puisse se développer que lorsqu'il est entouré complètement de liquide et c'est là la difficulté capitale.

2° Le rôle de la couche de vaseline n'est pas de créer des conditions subanaérobies parce qu'on cultive parfaitement bien le *Trichomonas* sur une plaque qui est seulement recouverte d'une bonne couche de liquide, mais on n'obtient pas alors la formation de colonies. La vaseline sert seulement à empêcher une dessiccation trop rapide du milieu à l'étuve.

3° La surface du milieu doit être riche en substances nutritives. La simple addition de gélose à l'œuf empêche la réussite.

En somme on peut dire que, même si l'on ensemence sur le milieu décrit un nombre assez réduit de *Trichomonas* et de bactéries pour permettre le développement en colonies isolées, l'humidité du milieu doit être telle que les bactéries envahissent toute la surface et par suite le repiquage du *Trichomonas* seul est impossible.

AMÉLIORATION DU MILIEU LIQUIDE. — Il fallait donc chercher dans une autre direction. Mais, avant toute autre expérience, il était nécessaire de trouver un milieu de culture plus favorable que celui de Boeck, qui ne donne que 20.000 individus de *Trichomonas* par centimètre cube, tandis que, dans les milieux des autres auteurs cités antérieurement, la culture est encore moins abondante.

Le milieu de Boeck à l'œuf-Ringer, recouvert de liquide ovomucoïde, peut être amélioré par :

a) Diminution de la quantité de liquide ovomucoïde. Le nombre des *Trichomonas* se développant au fond du tube augmente jusqu'à 200.000 par centimètre cube. Cela prouve encore que ce n'est pas l'anaérobiose qui conditionne l'abondance de la culture dans le fond du tube, mais plutôt que certaines substances diffusées de l'œuf coagulé sont là en plus grande concentration.

b) Addition de quelques gouttes de sérum humain. Par contre, l'addition de sang total, ou d'extrait d'amidon, est inutile et celle de gélose est nuisible. Ensuite, nous avons examiné de quel constituant de l'œuf provenaient les substances diffusées, favorables à la culture, en ensemençant d'un peu de culture de *Trichomonas* les milieux suivants :

- a) 1 cent. cube d'œuf cru stérile, blanc et jaune mélangés;
- b) 1 cent. cube de blanc cru;
- c) 1/2 cent. cube de jaune cru, dilué dans 10 cent. cubes de bouillon.

Après vingt-quatre heures, la culture dans l'œuf complet est meilleure que dans tout autre milieu. Les individus sont excessivement mobiles et leur nombre atteint 2 millions par centimètre cube. Après cinq jours, il y en a encore 20.000 par centimètre cube et, sous une couche d'huile de vaseline très épaisse (5 centimètres), la culture se conserve au moins pendant

un mois. Dans le blanc d'œuf, il y a un certain développement qui dépend des substances nutritives introduites avec la semence. Un deuxième repiquage dans le même milieu reste infructueux. Mais si l'on ajoute de l'« extrait globulaire » (préparé selon la méthode du D^r Legroux) à parties égales, on obtient un milieu de culture presque aussi favorable que le premier et qui a l'avantage d'être limpide.

Enfin on obtient aussi une bonne culture dans le bouillon au jaune d'œuf, mais elle est à tous points de vue inférieure à la première.

Il semble donc que, dans l'œuf cru et l'œuf coagulé, il y ait des substances diffusibles qui favorisent le plus la culture du *Trichomonas*. Par cela, nous sommes amenés à essayer le milieu suivant constitué par :

- a) 1 partie d'un extrait aqueux de jaune d'œuf ;
- 1 partie d'un extrait aqueux de blanc d'œuf ;
- 4 parties de bouillon.

Les extraits aqueux préparés selon la méthode générale de Legroux [55] après coagulation des albumines par l'alcool ou la chaleur. Dans ce milieu qui est limpide et dépourvu d'albumines, le *Trichomonas* se cultive très bien pendant deux jours.

Ainsi, nous avons trouvé quatre nouveaux milieux de culture, dont le premier est le plus pratique pour l'emploi ordinaire. Le premier jour, les individus sont très petits et groupés en amas, qu'on ne peut distinguer sous le microscope qu'après dilution dix fois dans l'eau physiologique. Les jours suivants, les individus deviennent plus grands et isolés. Avec ces milieux, nous avons effectué une nouvelle série d'essais de culture sur milieu solide, mais sans succès. Alors nous avons cherché un procédé pour *diminuer le nombre des bactéries dans les cultures du Trichomonas*.

PROCÉDÉS ANTIBACTÉRIENS.

1° Par l'action bactériostatique du blanc d'œuf. — En ajoutant quelque substance nutritive, ne pouvait-on pas faire un milieu de culture pour les flagellés qui ne soit défavorable que pour les bactéries? Nous avons essayé divers produits sans

succès à cause du *B. coli* toujours associé au *Trichomonas* et très peu exigeant.

2° Par *adsorption*. — L'action absorbante du kaolin agit aussi bien sur les *Trichomonas* que sur les bactéries. Un changement de pH ne pouvait pas changer ce résultat.

3° Par des *antiseptiques*. — Il résulte de nos expériences avec :

- a) Le violet de gentiane ;
- b) L'essence d'ail, de cannelle, de moutarde, de sauge, d'eucalyptus ;
- c) Le formol,

à diverses concentrations, avec une durée de contact variable, à la température du laboratoire ou de 37°, que le *Trichomonas* est toujours plus sensible que les bactéries, ce qui confirme les expériences des autres auteurs.

4° Par le *bactériophage*. — Par analyse bactériologique ordinaire, nous avons déterminé les diverses espèces bactériennes, associées au *Trichomonas*. Contre les trois souches auxquelles nous avons affaire, 2 de *B. coli* et 1 de staphylocoque, nous avons préparé des bactériophages et exalté leur activité au maximum. Au stade d'une lyse en bouillon paraissant totale, nous avons fait agir ces bactériophages sur la culture totale de *Trichomonas* et de bactéries dans du bouillon additionné d'extraits de jaune et de blanc. C'est le seul milieu qui permette la culture du *Trichomonas* et n'empêche pas l'action du bactériophage. Or il est connu que la lyse des souches de *B. coli* n'est jamais totale et qu'il se produit toujours une culture secondaire quand on n'a pas filtré. Aussi est-il arrivé que, la filtration étant ici impossible, après la lyse et un repiquage dans l'œuf complet, les souches lysées se sont régénérées. Il est donc improbable que l'on puisse éliminer les bactéries à l'aide d'un bactériophage.

5° Par l'*action lytique* de *Tyrothrix* *scaber*. — Le Dr Rosenthal a eu l'amabilité de repiquer pour nous une souche de ce streptothrix qui a une action très nette sur *B. coli* et les staphylocoques. Aux cultures de *Trichomonas*, nous avons ajouté du liquide lytique filtré ou non filtré provenant de cultures de *Tyrothrix* en bouillon âgées de une à trois semaines. De même nous avonsensemencé les cultures de *Trichomonas* avec le *Tyro-*

thrix. Une purification des cultures ne fut pas atteinte d'une part parce que la lyse n'est jamais complète, d'autre part parce que le liquide est toxique pour le *Trichomonas*.

6° Par *électrophorèse*. — Il est connu qu'on peut agglomérer les bactéries d'une culture à la cathode quand on fait passer un courant électrique. Ayant mis sur une lame une goutte de culture de *Trichomonas* entre deux feuilletes d'or sous lamelle, nous avons fait passer un courant électrique de 2 à 10 volts pendant un temps variable pour voir ce qui arriverait au *Trichomonas*. Il résulte de nos expériences que les flagellés restent bien sur place avec un courant faible, mais les bactéries ne s'agglomèrent pas complètement à la cathode. Avec un courant plus fort, tous les deux vont dans la même direction. Une purification bactériologique de la culture du *Trichomonas* n'était donc pas possible.

7° Par *dilution*. — Il ne nous restait donc plus une méthode bactériologique dans le sens vrai du mot. Nous avons alors cherché un procédé mécanique qui pouvait donner des résultats depuis que nous avons trouvé un milieu de culture excellent.

a) Ayant rempli 3 tubes de 15 centimètres de longueur, de 0 cm. 5 de diamètre intérieur, terminés par une pointe effilée et une ouverture microscopique, avec du liquide ovomucoïde ou de l'eau physiologique, on faisait tomber à la surface une goutte de culture riche en *Trichomonas*. Après cinq minutes, on pouvait recueillir sur une lame une goutte contenant quelques flagellés et très peu de bactéries qui étaient entraînées par les substances de l'œuf plus lourdes que l'eau. Cette goutte était réensemencée dans le second tube, mais cette fois-ci il fallait attendre très longtemps avant qu'on puisse recueillir une gouttelette positive. Celle-ci était alors ensemencée dans un tube d'œuf cru. Mais les contrôles montraient encore la présence de bactéries. Il aurait donc fallu diluer encore davantage dans un liquide qui ne permette pas la culture des bactéries, mais dans lequel le *Trichomonas* reste vivant. Nous l'avons vainement cherché.

b) Avec le procédé de dilution d'une goutte de culture dans du bouillon, *centrifugation* pendant cinq à dix minutes à + 600 tours par minute, dilution d'une goutte du sédiment,

nouvelle centrifugation, etc., nous avons réussi à éliminer la souche de staphylocoque. Une goutte du quatrième sédiment fut ajoutée à 10 cent. cubes de bouillon et ceux-ci furent répartis sur 100 tubes d'œuf cru. Après vingt-quatre heures, deux seulement contenaient des *Trichomonas* et tous étaient infectés par les bactéries. Après quarante-huit heures, tous les tubes contenaient une culture de *Trichomonas*; ce qui prouve que les individus immobiles, qui ne se développent plus dans les autres milieux de culture, recommencent à se multiplier après un jour dans l'œuf cru. Cette expérience montrait que les souches de *coli* sont sédimentées en même temps que le *Trichomonas* par centrifugation.

RÉSUMÉ. — Dans les recherches mentionnées ci-dessus nous avons essayé de purifier les cultures de *Trichomonas* :

- a) Par culture sur milieu solide.
- b) Par amélioration du milieu liquide.
- c) Par diminution du nombre des bactéries :
 - 1° par action bactériostatique du blanc d'œuf;
 - 2° par adsorption;
 - 3° par des antiseptiques;
 - 4° par le bactériophage;
 - 5° par le *Tyrothrix scaber*;
 - 6° par l'électrophorèse;
 - 7° par dilution;
 - 8° par centrifugation.

Aucun de ces procédés ne nous a donné un succès définitif, malgré quelques résultats intéressants. Reste donc seul le procédé de dilution simple qui n'est qu'une question de patience. Diluons par exemple dix fois 1 cent. cube de culture et répartissons le sixième tube de dilution sur 500 petits tubes d'œuf cru. Il existe alors la possibilité que deux de ces 500 tubes contiennent, après quarante-huit heures, une culture pure de *Trichomonas*. On ne peut dire que c'est un procédé pratique et nous ne l'avons pas employé.

Comme complément de ces recherches, il faut mentionner que les *Trichomonas*, après 6 et 10 passages *in vitro*, pouvaient encore infecter de petits chats et des singes. Ces expériences furent faites par le D^r R. Deschiens,

BIBLIOGRAPHIE

1. H. MOUTON. *Thèse de Sciences*, ch. V, 1902, p. 19-24 et *Ces Annales*, **16**, 1902.
2. K. M. LYNCH. *Amer. Journ. Trop. Dis. and Prev. Med.*, **11**, 1915, p. 627.
3. T. OHIRA et H. NOGUCHI. *Journ. Exp. Med.*, **25**, 1917, p. 341.
4. E. CHATTON. *Comptes rendus Soc. Biol.*, **81**, 13 avril 1918.
6. E. CHATTON. *Comptes rendus Soc. Biol.*, **81**, 6 juillet 1918.
7. E. CHATTON. *Comptes rendus Soc. Biol.*, **81**, 20 juillet 1918.
8. BOYD. *Journ. of Parasitology*, **11**, 1919.
9. CHATTON. *Comptes rendus Soc. Biol.*, **82**, 1920, p. 69.
10. E. PRINGAULT. *Bull. Soc. Path. exot.*, **13**, n° 10, 1920.
11. W. C. BOECK. *Journ. Exp. Med.*, **33**, 1921, p. 187.
12. A. BARRET. *Amer. Journ. Trop. Med. and Paras.*, **1**, 1921.
13. STARVEY, BARRET et NANCY YABRROUGH. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **1**, 1921, p. 161.
14. M. J. HOGUE. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **1**, 1921, p. 211.
15. K. M. LYNCH. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **2**, 1922, p. 215.
16. K. M. LYNCH. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **2**, 1922, p. 223.
17. STEGNER et BECKER. *Journ. of Parasit.*, **9**, 1922, p. 15.
18. K. M. LYNCH. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **2**, 1922, p. 531, 539.
19. M. SCHINDERA. *Archiv für Protistenkunde*, **45**, 1922, p. 200.
20. I. J. KLIGER. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **4**, 1924, p. 69.
21. J. V. BARROW. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **4**, p. 23.
22. BARRET et SMITH. *Amer. Journ. of Hyg.*, 1924.
23. W. C. BOECK. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **4**, 1924, p. 519, 535.
24. L. M. KENNETH. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **4**, 1924.
25. C. A. KOFOID et SWEZY. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **4**, 1924, p. 33.
26. A. ARNST. *Centralbl. f. Bakter.*, Abt. 1, Or. **93**, 1924, p. 257.
27. G. W. BOSCH. *Ned. Tydschr. v. Geneesk.*, 9 août 1924.
28. G. FRANCHINI. *Bull. Soc. Path. exot.*, **17**, 1924, p. 32.
29. W. F. GREENBEF. *Proc. Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, **21**, 1924, p. 405.
30. R. W. STEGNER. *Amer. Journ. of Hyg.*, **4**, 1924, p. 393.
31. W. KRANK. *Centralbl. f. Bakter.*, **92**, 1924, p. 216.
32. K. M. LYNCH. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **4**, 1924, p. 537.
33. P. POPOFF. *Journ. Trop. Med. and Hyg.*, **27**, n° 18, 1924.
34. R. R. STRONG. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **4**, 1924, p. 345.
35. L. B. SEVERTZKOFF. *Centralbl. f. Bakter.*, **92**, 1924, p. 151.
36. W. A. TAGLIAFERRO et F. HOLMES. *Amer. Journ. of Hyg.*, **4**, 1924, p. 1155.
37. J. W. WOLFF. *Thèse Amsterdam*, 1924.
38. ZOTTA et SONIA. *Comptes rendus Soc. Biol.*, **91**, 1924, p. 752.
39. W. C. BOECK et J. DRBOHLAV. *Amer. Journ. of Hyg.*, **5**, 1925, p. 371.
40. J. J. DRBOHLAV. *Annales de Parasit.*, **3**, n° 4, 1925.
41. J. J. DRBOHLAV. *Annales de Parasit.*, **3**, n° 4, 1925.
42. J. J. DRBOHLAV. *Annales de Parasit.*, **3**, n° 4, 1925.
43. J. J. DRBOHLAV. *Annales de Parasit.*, **3**, 1925, p. 364.
44. J. J. DRBOHLAV. *Annales de Parasit.*, **3**, 1925, p. 358.
45. J. J. DRBOHLAV. *Annales de Parasit.*, **3**, 1925, p. 358.
46. D. A. DE BEAUREPAIRE ARAGAO. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, f. 1, 1925, p. 143.
47. J. M. ANDREWS. *Amer. Journ. of Hyg.*, **5**, 1925, p. 555.

48. J. F. PEREY. *Comptes rendus Acad. Sc.*, **80**, 1925, p. 315.
49. GUÉRAIN et PONS. *Arch. Inst. Past. d'Indochine*, n° 2, 1925.
50. A. LWOFF. *Bull. Soc. Path. exot.*, **18**, 1925, p. 18.
51. H. NOGUCHI et A. LINDENBERG. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **5**, 1925, p. 63.
52. P. REZNIKOFFAUS R. CHAMBERS. *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, **22**, 1925, p. 386.
53. YAKIMOFF, WASSILEWSKY et ZWIETHOFF. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1925, p. 260.
54. MISAO TANABE. *Journ. of Parasit.*, 1926.
55. *Comptes rendus Acad. Sc.*, **167**, p. 597; *Comptes rendus Ac. Sc.*, **170**, p. 901;
Comptes rendus Acad. Sc., **173**, p. 1423.

(Institut Pasteur de Paris.)

**RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LE CHARBON
PRODUCTION D'UN SÉRUM ANTICHARBONNEUX ACTIF
PAR INJECTIONS SIMULTANÉES
DE LIQUIDE D'ŒDÈME
ET DE BACTÉRIDIES CHARBONNEUSES ANIMALISÉES**

par Ch. HRUSKA,
Institut sérothérapique vétérinaire à Ivanovice (Tchéco-Slovaquie).

(QUATRIÈME MÉMOIRE)

Bail (1) a montré la possibilité de vacciner activement les moutons contre le charbon au moyen du liquide d'œdème stérilisé par le toluène puis centrifugé. Cet auteur soutient que la bactéridie produit dans l'organisme des agressines, et que c'est grâce à elles que l'animal succombe à l'infection charbonneuse. D'après l'hypothèse de Bail, on peut obtenir au moyen des agressines stériles un sérum « antiagressine » qui neutralise les effets des agressines. Bail a fait des expériences sur le sérum antiagressine des moutons et a constaté ses effets protecteurs.

Nous avons repris la question et nous avons cherché à obtenir un sérum anticharbonneux en utilisant simultanément les injections du liquide d'œdème et de virus charbonneux animalisé.

On sait que les bovidés vaccinés contre le charbon présentent parfois, au point d'injection du vaccin, une énorme réaction œdémateuse qui se résorbe ensuite complètement. On sait, de plus, que c'est cette réaction œdémateuse qui occasionne la mort des animaux expérimentalement infectés avec des bactéridies. Nous ne connaissons pas la toxine charbonneuse, mais nous connaissons « l'état charbonneux », se traduisant par de l'œdème, qu'il s'agisse de l'infection expérimentale ou naturelle. Chez nos grands animaux producteurs de sérum, nous avons pu constater un œdème énorme au commencement de l'hyper-

(1) Cf. *Bakter*, 36 et 37,

immunisation ; puis, au fur et à mesure que l'on augmente les doses de virus, les animaux réagissent faiblement à la masse de virus injecté, que ce dernier soit introduit par la voie sous-cutanée, intraveineuse ou intrapéritonéale. La réaction ne cor-



FIG. 4. — Le cheval Cerano réagissant à l'injection de 20 cent. cubes des plasmoréagines vivantes, du cobaye et du lapin.

respond pas à la masse de virus injecté. L'organisme de l'animal hyperimmunisé vis-à-vis du charbon paraît être un milieu épuisé. C'est pourquoi on ne constate pas toujours dans le sérum une augmentation considérable du taux d'anticorps anticharbonneux,

Par contre, l'organisme hyperimmunisé se comporte tout autrement à l'égard du liquide d'œdème provenant d'animaux ayant succombé à l'inoculation du charbon sous la peau. Injectons, par exemple, au cheval hyperimmunisé, sous la peau, 10 cent. cubes de liquide d'œdème centrifugé; le lendemain nous constaterons un vaste œdème qui persiste pendant trois à cinq jours. Nous désignons cette réaction typique sous le nom d'*état charbonneux*; elle apparaît constamment après l'injection sous-cutanée de liquide d'œdème (fig. 1). L'étendue de la réaction dépend de la quantité de liquide injecté. La réaction rappelle celle que l'on observe chez le cheval au cours de l'hyperimmunisation contre la toxine diphtérique. Si on inocule sous la peau de l'encolure 300 cent. cubes de virus concentré à un cheval hyperimmunisé et si on injecte, du côté opposé, 5 cent. cubes de liquide d'œdème, on constate que la réaction qui suit l'injection de 5 cent. cubes de liquide d'œdème est beaucoup plus importante que celle qui suit l'inoculation de 300 cent. cubes de virus très concentré. Dans notre troisième mémoire sur le charbon (1), nous avons démontré la possibilité de cutivacciner le cobaye au moyen du liquide d'œdème provenant du lapin et du cobaye. Nous avons désigné la substance active sous le nom « de plasmoréagine charbonneuse », étant donné que l'organisme hyperimmunisé y répond toujours par une réaction typique. En injectant au cheval du liquide d'œdème de cobayes et de lapins et des bacilles animalisés, nous avons obtenu un sérum anticharbonneux, qui s'est montré, dans nos expériences, très supérieur au sérum que nous avons préparé jusqu'ici. Voici quelques-unes de nos expériences.

I. Essais effectués avec du sérum anticharbonneux ordinaire du cheval Acetum; avec du sérum normal de cheval, et avec notre nouveau sérum du cheval Cerano obtenu avec le liquide d'œdème et des bacilles animalisés vivants.

A. Les lapins reçoivent une seule fois le sérum par la voie sous-cutanée. Ils sont éprouvés, cinq jours après, avec 1 cent. cube d'une dilution à 1/100 de culture du charbon de vingt-quatre heures au même lieu d'inoculation.

(1) Ces *Annales*, 1926.

Sérum anticharbonneux ordinaire du cheval Acetum.

- 1^o Lapin de 950 grammes reçoit 1 cent. cube de sérum Charbon.
- 2^o Lapin de 870 grammes reçoit 2 cent. cubes de sérum Charbon.
- 3^o Lapin de 900 grammes reçoit 3 cent. cubes de sérum Charbon.
- 4^o Lapin de 1.400 grammes reçoit 4 cent. cubes de sérum Charbon.

Sérum normal de cheval.

- 1^o Lapin de 710 grammes reçoit 1 cent. cube de sérum Charbon
- 2^o Lapin de 920 grammes reçoit 2 cent. cubes de sérum Charbon.
- 3^o Lapin de 810 grammes reçoit 3 cent. cubes de sérum Charbon.
- 4^o Lapin de 1.510 grammes reçoit 4 cent. cubes de sérum Charbon.

Nouveau sérum anticharbonneux du cheval Cerano.

- 1^o Lapin de 1.240 grammes reçoit 1 cent. cube de sérum Charbon.
- 2^o Lapin de 810 grammes reçoit 2 cent. cubes de sérum Charbon.
- 3^o Lapin de 1.290 grammes reçoit 3 cent. cubes de sérum Résiste.
- 4^o Lapin de 870 grammes reçoit 4 cent. cubes de sérum Résiste.

B. Les lapins reçoivent deux fois le sérum par la voie sous-cutanée, la deuxième injection étant faite sept jours après la première.

Sérum anticharbonneux ordinaire du cheval Acetum.

- 1^o Lapin de 1.000 grammes reçoit en deux injections 2 cent. cubes de sérum Charbon.
- 2^o Lapin de 1.370 grammes reçoit en deux injections 4 cent. cubes de sérum Charbon.
- 3^o Lapin de 1.260 grammes reçoit en deux injections 6 cent. cubes de sérum Charbon.
- 4^o Lapin de 1.260 grammes reçoit en deux injections 8 cent. cubes de sérum Charbon.

Sérum normal de cheval.

- 1^o Lapin de 1.000 grammes reçoit en deux injections 2 cent. cubes de sérum Charbon.
- 2^o Lapin de 1.330 grammes reçoit en deux injections 4 cent. cubes de sérum Charbon.
- 3^o Lapin de 1.140 grammes reçoit en deux injections 2 cent. cubes de sérum Charbon.
- 4^o Lapin de 1.280 grammes reçoit en deux injections 8 cent. cubes de sérum Charbon.

Nouveau sérum anticharbonneux du cheval Cerano.

- 1^o Lapin de 1.360 grammes reçoit en deux injections 2 cent. cubes de sérum Résiste.
- 2^o Lapin de 1.250 grammes reçoit en deux injections 4 cent. cubes de sérum Résiste.

- 3^e Lapin de 1.800 grammes reçoit en deux injections 6 cent. cubes
de sérum Résiste.
- 4^e Lapin de 1.450 grammes reçoit en deux injections 8 cent. cubes
de sérum Résiste.

En faisant un mélange de liquide d'œdème et de notre sérum, et en l'injectant par la voie sous-cutanée à un cheval hyperimmunisé, on fait apparaître un énorme œdème.

Le liquide d'œdème, desséché à l'étuve, se dissout dans l'eau physiologique. Cette solution provoque, chez le cheval hyperimmunisé, la même réaction locale que le liquide d'œdème. La substance spécifique contenue dans le liquide traverse la bougie filtrante. Chauffée, elle se coagule. Le liquide qui exsude du coagulum, injecté à un cheval hyperimmunisé, provoque les mêmes réactions que le liquide dont il dérive. La substance spécifique est donc thermostable. L'extrait de rate des animaux ayant succombé au charbon (extrait par chauffage dans l'eau physiologique, à raison de 400 grammes de rate pour 300 cent. cubes d'eau physiologique) provoque, injecté à un cheval hyperimmunisé, les mêmes réactions. C'est le liquide d'œdème qui, à en juger par les réactions qu'il provoque, est le plus riche en substance active.

Dans le sang et dans la rate, celle-ci est en faible quantité; 5 cent. cubes de liquide d'œdème retiré du tissu sous-cutané provoquent, chez le cheval hyperimmunisé, la même réaction que l'injection de 300 cent. cubes d'extrait de rate ou de sang charbonneux.

Il existe donc, dans le liquide d'œdème des animaux morts de charbon, une substance qui permet de cutivacciner les cobayes et qui provoque, chez le cheval hyperimmunisé, un œdème énorme. Le sérum du cheval ainsi hyperimmunisé acquiert une haute valeur thérapeutique. Cette substance n'est pas neutralisée par l'antisérum du cheval hyperimmunisé avec le liquide d'œdème. Elle est thermostable; elle traverse les bougies filtrantes. Elle se trouve dans les diverses parties de l'organisme infecté en proportions différentes : abondante dans le liquide d'œdème sous cutané, elle est en petite quantité dans le sang et dans la rate charbonneuse.

Les organismes qui ne sont pas immunisés contre le charbon ne réagissent pas après les injections sous-cutanées des « plas-

moréagines charbonneuses stériles ». Notons seulement que les chevaux et les bovidés qui ne sont pas immunisés contre le charbon ne réagissent que par une élévation thermique passagère allant jusqu'à 40° et 41°.



FIG. 2. — Le cheval Avanti réagissant à l'injection de 300 cent. cubes des plasmoréagines (extrait de rate d'une vache charbonneuse).

Nous constatons donc que les substances appelées « agressines » par Bail ne sont pas neutralisées dans leur effet par le sérum « antiagressine », comme cet auteur l'a indiqué dans son hypothèse et que l'action de notre sérum n'est pas celle d'un sérum antiagressine dans le sens de l'hypothèse de Bail.

Ayant enregistré chez les lapins des résultats favorables avec

le sérum du cheval traité au moyen des « plasmoréagines charbonneuses vivantes » et des bacilles animalisés, nous avons poussé notre étude plus loin.

Pour le titrage chez les lapins, nous nous sommes servi de deux injections successives de sérum. La deuxième injection, faite le septième jour après la première, provoque une réaction anaphylactique, caractérisée par un œdème de la peau qui dure trois ou quatre jours. Le cinquième jour, quand la réaction a presque complètement disparu, nous avons éprouvé les lapins.

Nous basant sur cette réaction, nous avons émis l'idée suivante : le lapin qui est passivement immunisé avec le sérum spécifique grâce à la réaction anaphylactique, doit être mieux protégé contre l'infection charbonneuse que le lapin protégé avec le sérum normal, ce dernier devant succomber plus vite que le premier à l'inoculation d'épreuve. Cette hypothèse a été trouvée exacte au cours de nos expériences.

Pour le titrage, nous avons employé deux lots de lapins, dont l'un a été traité par la voie sous-cutanée une fois, et le deuxième deux fois par les sérums spécifiques et normaux. L'infection des lapins a été faite avec la dilution de 1/10 à 1/1.000 de charbon par voie sous-cutanée.

Nous avons démontré dans notre troisième mémoire l'impossibilité d'immuniser le cobaye par le liquide d'œdème chauffé. Mais, ayant constaté que la substance contenue dans ce liquide d'œdème est thermostable, c'est-à-dire qu'elle provoque des réactions œdémateuses chez le cheval hyperimmunisé, nous avons voulu rechercher la valeur des anticorps spécifiques produits par le cheval. Voici les résultats que nous avons obtenus avec les trois chevaux immunisés par les procédés différents :

1° Cheval *Cerano*, immunisé d'abord par les bactériidies, et ensuite hyperimmunisé avec les « plasmoréagines charbonneuses vivantes » du lapin et du cobaye et avec des bacilles animalisés. Ce cheval a reçu, en tout, dans l'intervalle du 3 mars au 15 mai 1924, 80 cent. cubes de liquide d'œdème ;

2° Cheval « *Cerès* », immunisé d'abord par les bactériidies et ensuite hyperimmunisé avec les plasmoréagines charbonneuses mortes (du lapin et du cobaye) et avec des bacilles animalisés morts. Ce cheval a reçu, en tout, du 10 avril au 30 mai 1925, 80 cent. cubes de liquide d'œdème mort ;

3° Cheval « *Acetum* » ; a fourni le sérum anticharbonneux ordinaire. Voici une série de titrages.

II. *Essais effectués avec le sérum anticharbonneux ordinaire du cheval Acetum; le sérum normal de cheval; le sérum du cheval Cerano et le sérum du cheval Cerès.*

A. Les lapins ont reçu une seule fois du sérum. L'infection a été réalisée avec 0 c.c. 1 d'une dilution de 1/10^e de culture du charbon de vingt-quatre heures; cette épreuve ayant lieu cinq jours après l'injection du sérum au même lieu d'inoculation.

Sérum anticharbonneux ordinaire du cheval Acetum.

- | | |
|---|----------|
| 1 ^o Lapin de 950 grammes reçoit 1 cent. cube de sérum | Charbon. |
| 2 ^o Lapin de 1.600 grammes reçoit 3 cent. cubes de sérum | Charbon. |
| 3 ^o Lapin de 1.120 grammes reçoit 5 cent. cubes de sérum | Charbon. |

Sérum normal du cheval.

- | | |
|--|----------|
| 1 ^o Lapin de 1.160 grammes reçoit 1 cent. cube de sérum. | Charbon. |
| 2 ^o Lapin de 990 grammes reçoit 3 cent. cubes de sérum | Charbon. |
| 3 ^o Lapin de 1.150 grammes reçoit 5 cent. cubes de sérum. | Charbon. |

Sérum anticharbonneux du cheval Cerès.

- | | |
|---|----------|
| 1 ^o Lapin de 1.900 grammes reçoit 1 cent. cube de sérum. | Charbon. |
| 2 ^o Lapin de 1.570 grammes reçoit 3 cent. cubes de sérum | Charbon. |
| 3 ^o Lapin de 980 grammes reçoit 5 cent. cubes de sérum. | Charbon. |

Sérum anticharbonneux du cheval Cerano.

- | | |
|---|----------|
| 1 ^o Lapin de 1.000 grammes reçoit 1 cent. cube de sérum. | Charbon. |
| 2 ^o Lapin de 980 grammes reçoit 3 cent. cubes de sérum | Charbon. |
| 3 ^o Lapin de 1.400 grammes reçoit 5 cent. cubes de sérum | Résiste. |

B. Les lapins reçoivent deux fois le sérum par la voie sous-cutanée, la deuxième injection du sérum ayant lieu sept jours après la première.

Sérum anticharbonneux ordinaire du cheval Acetum.

- | | |
|---|----------|
| 1 ^o Lapin de 1.140 grammes reçoit en deux injections 2 cent. cubes de sérum | Charbon. |
| 2 ^o Lapin de 1.440 grammes reçoit en deux injections 6 cent. cubes de sérum | Résiste. |
| 3 ^o Lapin de 1.310 grammes reçoit en deux injections 10 cent. cubes de sérum | Charbon. |

Sérum normal du cheval.

- | | |
|--|----------|
| 1 ^o Lapin de 1.260 grammes reçoit en deux injections 2 cent. cubes de sérum | Charbon. |
|--|----------|

2 ^o Lapin de 1.500 grammes reçoit en deux injections 6 cent. cubes de sérum	Charbon.
3 ^o Lapin de 1.560 grammes reçoit en deux injections 10 cent. cubes de sérum	Charbon.

Sérum anticharbonneux du cheval Cerès.

1 ^o Lapin de 1.800 grammes reçoit en deux injections 2 cent. cubes de sérum	Charbon.
2 ^o Lapin de 1.450 grammes reçoit en deux injections 6 cent. cubes de sérum	Charbon.
3 ^o Lapin de 1.440 grammes reçoit en deux injections 10 cent. cubes de sérum	Charbon.

Sérum anticharbonneux du cheval Cerano.

1 ^o Lapin de 1.100 grammes reçoit en deux injections 2 cent. cubes de sérum	Résiste.
2 ^o Lapin de 1.100 grammes reçoit en deux injections 6 cent. cubes de sérum	Résiste.
3 ^o Lapin de 1.600 grammes reçoit en deux injections 10 cent. cubes de sérum	Résiste.

Deux lapins témoins, sans sérum, succombent au charbon. Tels sont les résultats obtenus dans nos nombreuses expériences.

Nous voyons donc qu'on peut différencier le sérum anticharbonneux ordinaire du sérum normal par deux inoculations successives chez les lapins. De plus, au moyen de la même méthode de titrage, nous avons pu mettre très clairement en lumière qu'il y a une différence entre les effets protecteurs de notre nouveau sérum anticharbonneux et le sérum anticharbonneux ordinaire. Au cours de nos travaux, nous avons parfois obtenu des résultats moins favorables dans le titrage, mais nous avons toujours constaté la supériorité préventive du nouveau sérum.

Notons, en outre, que tous les lapins survivants, inoculés de nouveau une semaine plus tard avec la même dose de la culture, mais cette fois-ci sans recevoir de sérum, ont tous succombé au charbon.

Nous sommes convaincu que notre sérum permet de lutter avec succès au point de vue thérapeutique contre l'infection charbonneuse. Voici à titre d'illustration trois épreuves thérapeutiques :

1^o Le charbon venait d'éclater dans une étable contenant une

trentaine de bovidés. On employa plus de 14 litres de sérum anticharbonneux ordinaire sans obtenir de résultat. 5 bovidés succombèrent au charbon. En arrivant dans cette étable, nous trouvâmes que la plupart des animaux étaient malades. En employant notre sérum, la maladie fut arrêtée et aucun nouveau cas mortel ne fut enregistré dans la suite.

2° Dans une autre étable contenant une cinquantaine de bovidés, le charbon venait d'éclater. 4 bovidés succombèrent. Le sérum anticharbonneux ordinaire resta sans résultats. C'est seulement grâce à l'intervention de notre sérum que l'infection fut arrêtée et que les malades guérirent. Seule une vache succomba au charbon, quinze minutes après notre arrivée.

Cette vache avait reçu le sérum alors qu'elle était à l'agonie.

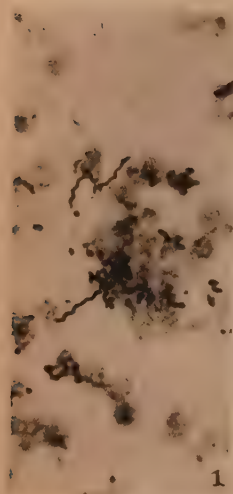
3° Le charbon était apparu dans une troisième étable contenant une soixantaine de bovidés. Au bout de sept jours, 12 animaux succombèrent, quoiqu'on eût utilisé 16 litres de sérum anticharbonneux ordinaire. Plusieurs animaux avaient reçu jusqu'à un litre de sérum sans résultat. En arrivant, nous trouvâmes 7 bovidés dans un état très grave ; 12 autres très atteints. Après l'injection de notre sérum, l'infection fut arrêtée et tous les malades furent sauvés, sauf deux qui avaient été traités alors qu'ils étaient déjà en agonie.

Ces trois résultats pratiques nous ont convaincu de la grande valeur thérapeutique du nouveau sérum.

En utilisant des « plasmoréagines charbonneuses mortes », nous n'avons pas pu constater, chez le cheval déjà immunisé, un effet protecteur de son sérum. Cette constatation est en plein accord avec nos recherches sur l'immunisation active du cobaye au moyen de la substance chauffée contenue dans le liquide d'œdème, où nous n'avons enregistré que des échecs.

Nous devons pourtant noter la thermostabilité de cette substance, grâce à laquelle on peut provoquer un œdème énorme chez le cheval hyperimmunisé, et grâce à laquelle on peut aussi provoquer une fièvre passagère chez les animaux non immunisés.

Le Gérant : G. MASSON.





13



14



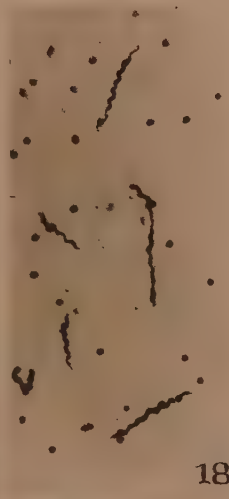
15



16



17



18



19



20



a

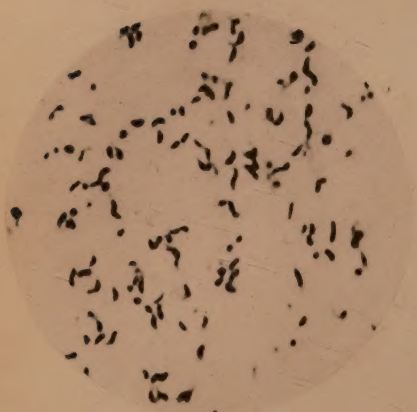


b



c

21



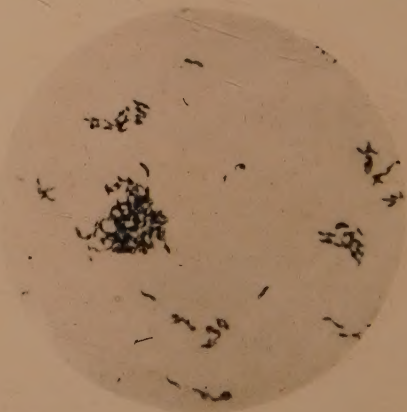
22



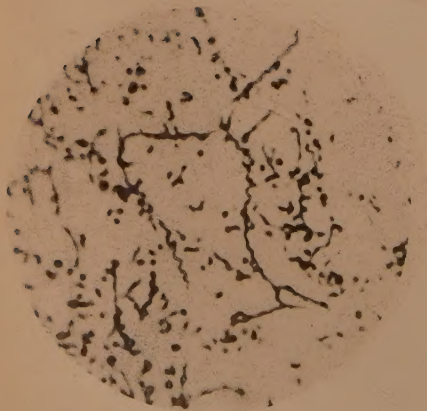
23



24



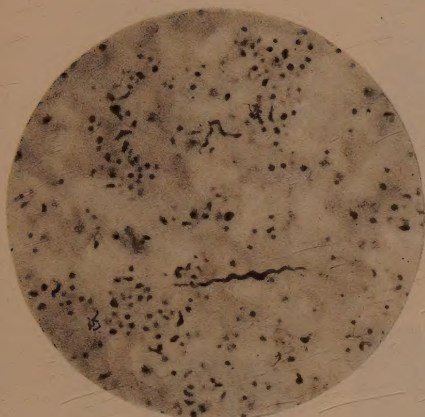
25



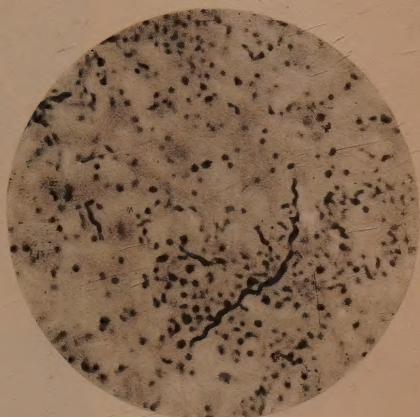
26



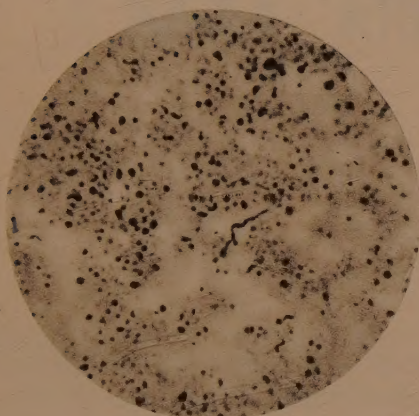
27



28



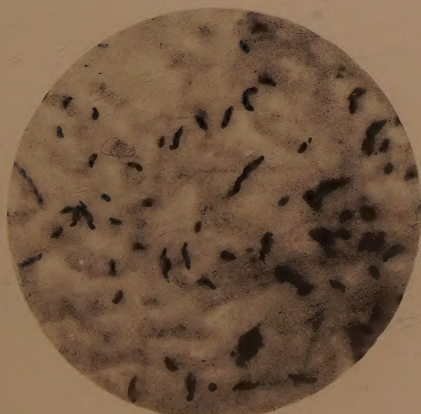
29



30



31



32



33

